UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

RESPUESTA MORFOGENÉTICA Y VARIACIÓN SOMACLONAL EN DOS ESPECIES DE *AGAVE* REGENERADAS *IN VITRO.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA

PRESENTA:

IRENE MARTÍNEZ VELASCO

MODALIDAD: TESIS

ASESORES:

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

NOVIEMBRE, 2019.

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS MUNICIPIO DE TOLUCA, MEXICO

ÍNDICE

Lista de figuras…… xi

Lista de tablas…… xiv

Lista de abreviaturas……..xviii

Resumen……..... xix

Abstract…….. xxi

I. INTRODUCCIÓN 1

II. OBJETIVOS..... 4

II.1 Objetivos generales 4

II.2 Objetivos específicos 4

III. HIPOTESIS 5

IV. REVISIÓN DE LITERATURA..... 6

IV.1 Generalidades del género Agave 6

IV.2 *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck 9

IV.3 *Agave marmorata* Roezl 13

IV.4 Cultivo de tejidos vegetales 17

IV.1.1.1 Morfogénesis *in vitro*……..……...18

IV.4.1.2 Organogénesis……..……..……..19

IV.4.1.2.1 Organogénesis directa…….20

IV.4.1.2.2 Organogénesis indirecta…….…….21

IV.5 Reguladores de crecimiento vegetal utilizados en la micropropagación ……..23

IV.5.1 Auxinas……24

IV 5.2 Citocininas……..……..……25

IV.6 Explante..... 25

IV.6.1 Desinfección en el cultivo *in vitro*.....27

IV.7 Aclimatación 29

IV.8 Variación somaclonal 31
IV.8.1 Marcadores moleculares…… 35
IV.8.2 PCR…… 36
IV.8.2.1 Los reactivos……38
IV.8.3 Electroforesis……40
IV.8.4 RAPD…… ……41
IV.8.5 SSR……..44
V. MATERIALES Y MÉTODOS **47**
V.1 Localización del área de estudio 47
V.2 Material biológico experimental 47
V.2.1 Explantes utilizados en el Experimento 1……49
V.2.2 Explantes utilizados en el Experimento 2……49
V.2.3 Explantes utilizados en el Experimento 3……51
V.3 Desinfección del material 52
V.3.1 Desinfestación de semillas. 52
V.3.2 Desinfección de explantes *ex vitro* para el E3 53
V.4 Inducción de callogénesis 54
V.5 Organogénesis directa e indirecta 55
V.6 Aclimatación de plantas a condiciones *ex vitro* 56
V.7 Estudio de la variabilidad genética 57
V.7.1 Procedimientos generales…… 57
V.7.2 Análisis del ADN extraído……....59
V.7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)…….. ……59
V.7.4 Selección de cebadores……..60
V.7.4.1 Separación de los fragmentos amplificados……62
V.8 Variables evaluadas 63
V.9 Análisis estadístico 65

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 67

VI.1 Evaluación de la contaminación 67

VI.2 Experimento 1..... 69

VI.2.1 Inducción de callogénesis en el E1 69

VI.2.1.1 Inducción de organogénesis indirecta en el E1……..…… 71

VI.2.2 Experimento 2 73

VI.2.2.1 Inducción de callogénesis en el E2……..……..74

VI.2.2.2 Inducción de organogénesis indirecta en el E2…….……..75

VI.2.2.3 Inducción de organogénesis directa en el E2…….…….. 77

VI.2.3 Experimento 3 79

VI.2.3.1 Inducción de callogénesis en el E3……....79

VI.2.3.2 Inducción de organogénesis indirecta en el E3…….……..82

VI.2.3.3 Inducción de organogénesis directa en el E3……..……83

VI.2.4 Comparación entre experimentos 84

VI.2.4.1 Callogénesis……..…… 84

VI.2.4.2 Organogénesis indirecta……...……..90

VI.2.4.3 Organogénesis directa…….……95

VI.2.4.4 Organogénesis indirecta *vs* organogénesis directa……98

VI.3 Aclimatación de plantas 101

VI.4 Evaluación de la variación somaclonal 108

VI.4.1 Determinación cuantitativa 108

VI.4.2 Amplificación de ADN..... 110

VI.4.2.1 Experimento 1……..…… 111

VI.4.2.2 Experimento 2……..……..……114

VI.4.2.3 Experimento 3…… 117

VI.4.2.4 Marcadores RAPD……..……...125

VI.4.2.5 Marcadores ASSR……..……...……..…126

VI.5 Variación somaclonal..... 127

VII. **CONCLUSIONES 131**

VIII. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 132**

Lista de Figuras

Figura 1. El maguey y sus partes. 7

Figura 2. *Agave salmiana.* 10

Figura 3. *Agave marmorata.* 14

Figura 4. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 38

Figura 5. Pasos de la técnica RAPD. 43

Figura 6. Pasos de la técnica SSR. 45

Figura 7. Esquema de las fases experimentales. 48

Figura 8. Plántula de *A. salmiana* germinada *in vitro* a los 45 ddic. 50

Figura 9. Plántula de *A. salmiana* y *A. marmorata* cultivadas *ex vitro* empleadas en el experimento E3. 52

Figura 10. Plántula de 6 meses de *A. salmiana* antes de realizar el primer corte. 53

Figura 11. Establecimiento de las condiciones para la inducción de morfogénesis y posterior evaluación genética de los clones en ambas especies de *Agave*. 58

Figura 12. Proceso de amplificación de ADN. 63

Figura 13. Plántulas obtenidas de semilla a los 45 ddic de *A. salmiana y A. marmorata*. 74

Figura 14. Callos obtenidos de *A. salmiana* con una concentración de 1 mg L^{-1} de 2,4-D y 15 mg L^{-1} de BA en el E1, E2 y E3; callos obtenidos de *A. marmorata* con una concentración de 5 mg L^{-1} de 2,4-D y 3 mg L^{-1} de BA en los experimentos E1, E2, E3. 89

Figura 15. Brotes obtenidos vía OI de *A. salmiana* con una concentración de 10 mg L^{-1} de BA; brotes obtenidos de *A. marmorata* con una concentración de 5 mg L^{-1} de BA en los experimentos E1, E2, E3._____ 92

Figura 16. Brotes obtenidos vía OD de *A. salmiana* con una concentración de 10 mg L^{-1} de BA en los E2 y E3; brotes obtenidos de *A. marmorata* con una concentración de 5 mg L^{-1} de BA en los experimentos E2 y E3._____ 97

Figura 17. Brotes de *A. salmiana* y *A. marmorata* a los 30 ddic._____102

Figura 18. Plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* de los experimentos E1, E2, E3 en la charola con plugs de espuma fenólica a los 30 ddia._____104

Figura 19. Plántulas *ex vitro* de *A. salmiana* y *A. marmorata* después de 30 días de aclimatación._____ 106

Figura 20. Dendrograma mostrando el agrupamiento de seis clones de *A. salmiana* y *A. marmorata*, respectivamente en el E1 obtenido a partir del análisis con iniciadores RAPD y ASSR basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA._____ 113

Figura 21. Dendrograma mostrando el agrupamiento de seis clones de *A. salmiana* y *A. marmorata*, respectivamente en el E2 obtenidos a partir del análisis con iniciadores RAPD y ASSR basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA._____ 116

Figura 22. Dendrograma mostrando el agrupamiento de seis clones de *A. salmiana* y *A. marmorata*, respectivamente en el E3 obtenidos a partir del análisis con iniciadores RAPD y ASSR basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA._____ 119

Figura 23. Productos de amplificación de PCR utilizando el marcador Y24 RAPD con un iniciador de 10 bases en plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* del experimento E1, E2 y E3. _____121

Figura 24. Productos de amplificación de PCR utilizando el marcador Y41 RAPD con un iniciador de 10 bases en plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* de los experimentos E1, E2 y E3._____122

Figura 25. Productos de amplificación de PCR utilizando el marcador ASSR20 con un iniciador de 17 bases en plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* de los experimentos E1, E2 y E3._____123

Figura 26. Productos de amplificación de PCR utilizando el marcador ASSR29 con un iniciador de 17 bases en plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* de los experimentos E1, E2 y E3._____ _____124

Figura 27. Matriz binaria mostrando el polimorfismo generados con dos primers tipo RAPD de diez bases para el análisis de Variación Somaclonal en plántulas regeneradas de *A. salmiana* y *A. marmorata* de los experimentos E1, E2 y E3._____125

Figura 28. Matriz binaria mostrando el polimorfismo generados con dos primers tipo ASSR de diez bases para el análisis de Variación Somaclonal en plántulas regeneradas de *A. salmiana* y *A. marmorata* de los experimentos E1, E2 y E3._____ 126

Lista de Tablas

Tabla 1. Investigaciones realizadas en diversas especies de *Agave* mediante organogénesis directa e indirecta _____ 22-23

Tabla 2. Investigaciones realizadas con RAPD y SSR para la detección de la Variación Somaclonal. _____ 46

Tabla 3. Lugares de colecta de semilla de cada especie de *Agave*. _____47

Tabla 4. Medio de cultivo utilizado para germinar semillas y crecimiento de los brotes regenerados de ambas especies de *Agave*. _____ 49

Tabla 5. Características de las plantas cultivadas *in vitro* utilizadas en el E2._ 50

Tabla 6. Características de las plantas cultivadas *ex vitro* utilizadas en el E3._ 51

Tabla 7. Tratamientos evaluados para inducir callogénesis en *A. salmiana* y *A. marmorata* en los experimentos E1, E2 y E3._____55

Tabla 8. Concentraciones de citocinina evaluadas en la organogénesis de ambas especies de *Agave.* _____ 56

Tabla 9. Reactivos y volumen utilizado para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)._____ 60

Tabla 10. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación en PCR del ADN nuclear de *A. salmiana* y *A. marmorata*._____61

Tabla 11. Análisis de varianza para evaluar el peso de callo a los 90 ddic en el E1 en *A. salmiana* y *A. marmorata*. _____71

Tabla 12. Análisis de varianza para evaluar la inducción de brotes vía OI a los 90 ddic en el E1 en A. salmiana y A. marmorata. _____73

Tabla 13. Análisis de varianza para evaluar el peso de callo a los 90 ddic en el E2 en *A. salmiana* y *A. marmorata*. _____75

Tabla 14. Análisis de varianza para evaluar la inducción de brotes vía OI a los 90 ddic en el E2 en *A. salmiana* y *A. marmorata*._____77

Tabla 15. Análisis de varianza para evaluar la inducción de brotes vía OD a los 90 ddic en el E2 en *A. salmiana* y *A. marmorata*. _____79

Tabla 16. Análisis de varianza para evaluar peso de callo a los 90 ddic en el E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*. _____ 81

Tabla 17. Análisis de varianza para evaluar la regeneración de brotes vía OI a los 90 ddic en el E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*. _____83

Tabla 18. Análisis de varianza para evaluar la regeneración de brotes vía OD a los 90 ddic en el E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata.*_____84

Tabla 19. Análisis de varianza para evaluar el peso de callo del experimento E1, E2 y E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*._____87

Tabla 20. Análisis de las variables evaluadas para la inducción de callogénesis en los experimentos E1, E2 y E3 de *A. salmiana* y *A. marmorata* en los diferentes tratamientos probados bajo condiciones de oscuridad._____ 88

Tabla 21. Análisis de varianza para evaluar los tratamientos respecto a la regeneración de brotes vía OI en *A. salmiana* y *A. marmorata* en los experimentos E1, E2 y E3. _____ 93

Tabla 22. Comparación de medias del número y longitud de brotes obtenidos en *A. salmiana* y *A. marmorata* vía OI. _____ 94

Tabla 23. Análisis de varianza para evaluar los tratamientos respecto a la regeneración de brotes vía OD en *A. salmiana* y *A. marmorata* en los experimentos E1, E2 y E3. _____ 96

Tabla 24. Comparación de medias del número y longitud de brotes de *A. salmiana* y *A. marmorata* obtenidos vía OD en el experimento E2 y E3_____96

Tabla 25. Mejores tratamientos del experimento E1, E2 y E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*._____ 100

Tabla 26. Resultados de las variables evaluadas durante el proceso de aclimatación de las plántulas regeneradas de *A. salmiana* y *A. marmorata*. __107

Tabla 27. Resultados de cuantificación espectrofotométrica de los extractos de ADN obtenidos a partir de las plántulas regeneradas mediante los tres experimentos realizados en este trabajo en *A. salmiana* y *A. marmorata*; mediante la técnica CTAB._____ 110

Tabla 28. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud de plántulas regeneradas vía OI de *A. salmiana* en el E1._____112

Tabla 29. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud de plántulas regeneradas vía *A. marmorata* en el E1._____ 112

Tabla 30. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados vía OI E1 de *A. salmiana*, usando iniciadores RAPD y ASSR._____114

Tabla 31. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados vía OI en el E1 de *A. marmorata*, usando iniciadores RAPD y ASSR._____ 114

Tabla 32. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud en plántulas regeneradas de *A. salmiana* del E2 vía OD y OI._____ 115

Tabla 33. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud en plántulas regeneradas de *A. marmorata* del E2 vía OD y OI._____ 115

Tabla 34. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados de *A. salmiana* vía OD y OI del E2, usando iniciadores RAPD y ASSR._____ 117

Tabla 35. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados de *A. marmorata* vía OD y OI del E2, usando iniciadores RAPD y ASSR._____ 117

Tabla 36. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud de plántulas regeneradas vía OD y OI de *A. salmiana* del E3._____ _____ 118

Tabla 37. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud de plántulas regeneradas vía OD y OI de *A. marmorata* del E3._____119

Tabla 38. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados vía OD y OI de *A. salmiana* del E3, usando iniciadores RAPD y ASSR._____120

Tabla 39. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados vía OD y OI de *A. marmorata* del E3, usando iniciadores RAPD y ASSR._____120

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido clorhídrico	HCL
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D
Ácido etilen diamino tetra acético	EDTA
Amplificación aleatoria del ADN polimórfico	RAPD
Agave marmorata	*Am*
Agave salmiana	*As*
Bencil amino purina (N^6 Benziladenina)	BA
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio	CTAB
Cultivo de tejidos vegetales	CTV
Embrión cigótico	EC
Experimento 1	E1
Experimento 2	E2
Experimento 3	E3
Individuo	Indv
Murashige y Skoog	MS
Organogénesis directa	OD
Organogénesis indirecta	OI
Ribonucleasa A	RNAsa
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Reguladores de crecimiento vegetal	RCV
Hidroximetil amino metano (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol)	TRIS
Variación somaclonal	VS
Zona meristemática	ZM
Campana de flujo laminar	CFL

RESUMEN

RESPUESTA MORFOGENÉTICA Y VARIACIÓN SOMACLONAL EN DOS ESPECIES DE AGAVE REGENERADAS *IN VITRO*.

Irene Martínez-Velasco*. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Asesores: Amaury Martín Arzate-Fernandez[1] y José Luis Piña-Escutia[2].

*Autor para correspondencia: irene_199504@hotmail.com, amaury1963@yahoo.com.mx
[1, 2] Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.; [2]jlpinae@uaemex.mx

Los agaves en México son plantas con gran valor económico, gastronómico y cultural. A pesar de las múltiples formas de reproducción de las plantas pertenecientes al género *Agave*, pero su lento crecimiento, bajo porcentaje de viabilidad de semilla, destrucción de su hábitat, saqueo desmedido, interrupción de su ciclo de maduración por el aprovechamiento de sus productos, se ha logrado establecer técnicas biotecnológicas para su propagación, conservación y mejoramiento genético. En el presente se seleccionó una especie representativa para la producción de pulque (*Agave salmiana*) (As) y una en la producción de mezcal (*Agave marmorata*) (Am) para establecer un protocolo de micropropagación optimizando las concentraciones de la citocinina bencilaminopurina (BA) y de la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sobre la morfogénesis *in vitro* de ambas especies. Sin embargo, aún falta establecer un protocolo eficiente que permita regenerar plantas genéticamente uniformes. Se probaron dos técnicas de cultivo *in vitro* con tres diferentes explantes: embrión cigótico, zona meristemática (ZM) de plántulas germinadas *in vitro* de 45 días y zona meristemática de plántulas de seis meses germinadas bajo condiciones *ex vitro*. Se logró la regeneración de brotes en todos los experimentos probados; el mayor número de brotes en *A. salmiana* fue de 23.8 utilizando la ZM de plantas germinadas *in vitro* regenerados de forma directa usando una concentración de 10 mg L^{-1} de BA, mientras que en Am se alcanzó la cantidad de 24.7 brotes/explante con 5 mg L^{-1} de BA utilizando como explante un embrión cigótico que pasó por una fase de callo.

Se evaluó la Variación Somaclonal de los clones obtenidos mediante la técnica RAPD y ASSR. Los resultados indican que solo en aquellos clones que pasaron por una fase de callo se detectó Variación Somaclonal, por el contrario, los clones desarrollados por organogénesis directa fueron estables genéticamente. Por lo tanto, en el presente trabajo se logró establecer un protocolo eficiente de propagación para *A. salmiana* y *A. marmorata*, las plántulas regeneradas *in vitro* que presentan estabilidad genética podrían ser utilizadas en programas de propagación masiva, mientras que aquellas que

presentaron Variación Somaclonal pueden ser usadas en programas de mejoramiento u otras investigaciones.

Palabras clave: *Agave salmiana*, *Agave marmorata*, organogénesis directa e indirecta. Variación Somaclonal; PCR; RAPDs y ASSR.

ABSTRACT

MORFOLOGICAL RESPONSE AND SOMACLONAL VARIATION IN TWO SPECIES OF IN VITRO REGENERATED *AGAVE* PLANTS.

Irene Martínez-Velasco*. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Advisors: Amaury-Martín Arzate-Fernandez[1] y José Luis Piña-Escutia[2].

*Corresponding author: irene_199504@hotmail.com, amaury1963@yahoo.com.mx

[1, 2] Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. [2]jlpinae@uaemex.mx

Agaves in Mexico are plants with great economic, gastronomic and cultural value. Despite the multiple forms of reproduction of plants belonging to the genus *Agave*, but due to its slow growth, low percentage of seed viability, destruction of its habitat, excessive looting, interruption of its ripening cycle due to the use of their different organs, it has been posible to establish biotechnological techniques for its propagation, conservation and genetic improvement.

At present, a representative specie for pulque production (*A. salmiana*) (As) and one in the production of mezcal (*Agave marmorata*) (Am) were selected to establish an efficient micropropagation protocol optimizing the concentrations of the citokinin benzylaminopurine (BA) and the auxin dichlorophenoxyacetic (2,4-D), on the *in vitro* morphogenesis of both species. However, there is still an efficient protocol that allows regenerating genetically uniform plants. Shoots regeneration was achieved in all tested experiments; the highest number of shoots in As was 23.8 using the ZM of directly regenerated *in vitro* germinated plants using a concentration of 10 mg L^{-1} of BA, while in Am the amount of 24.7 shoots/explant was reached with 5 mg L^{-1} of BA using the zygotic embryo throughing a callus phase.

The Somaclonal Varation of the obtained clones using the RAPD and ASSR technique was evaluated. The results indicate that only in those clones obtained by a callus phase, Somaclonal Variation was observed, on the contrary, the clones developed by direct organogenesis were genetically similar. Therefore, in the present work it was posible to establish an efficient propagation protocol for As and Am. Thus, regenerated seedlings that have genetic stability could be used in mass propagation programs while those that presented Somaclonal Variation could be used in breeding programs or other researchs.

Keywords: *Agave salmiana*, *Agave marmorata*, direct and indirect organogenesis. Somaclonal variation; PCR; RAPDs y ASSR

I. INTRODUCCIÓN

El género *Agave* incluye alrededor de 200 especies y el 75% de éstas tiene como centro de origen a México (Álvarez de Zayas, 1989; Garcia-Mendoza, 2007; Reinchenbacher, 1985; Gentry, 1982).

Las plantas del género *Agave* tienen dos tipos de reproducción; sexual y asexual (Alfonso-León, 2014). La maduración de la planta para que ocurra la reproducción sexual, dependiendo de la especie, puede variar entre 10-25 años (Monja-Mio *et al*., 2018; Narváez-Suárez *et al*.,2016). Existen dos vías de reproducción asexual; por bulbilos, los cuales se desarrollan a partir de la zona meristemática apical que crece en la inflorescencia (Binh *et al*.,1990) y la propagación por rizoma, siendo esta última la más empleada para establecer plantaciones comerciales de agave, ya que solo tarda 5 años para que la planta comience a producir hijuelos, contrario a la formación de bulbilos donde se debe esperar a que la planta llegue a su madurez completa (Puente-Garza, Gutiérrez-Mora, & García-Lara, 2015).

Sin embargo, la desventaja de la reproducción asexual y la generación de clones por la propagación de rizomas resulta en una baja variabilidad genética en las poblaciones de agave, haciendo el mejoramiento genético de estas plantas un problema muy difícil de resolver (Flores-Benítez *et al*., 2007).

Entre los usos más comunes del género se encuentra la producción de fermentados y destilados, algunas de las especies más representativas en la elaboración de bebidas emblemáticas de maguey son; la especie *A. marmorata* empleada para la fabricación de mezcal (Nieto *et al*., 2016), y para la extracción de pulque se utiliza mayormente *A. salmiana* (Rodríguez-Ortiz *et al*., 2014). Debido a la alta demanda actual del mercado en la industria mezcalera así como el auge creciente e interés por el pulque, ambas especies se encuentran bajo amenaza, aunado a ello la urbanización, alteración de su hábitat y baja tasa de reproducción por los ciclos largos de maduración hacen a estas dos especies de interés para su desarrollo y conservación.

Por lo antes mencionado, el uso del cultivo *in vitro* ofrece una serie de ventajas, como obtener poblaciones con características elite, tolerancia al estrés, libres de patógenos, y antecedentes genéticos estables (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Esta técnica también puede proporcionar material para la mejora del cultivo, utilizando herramientas de mejoramiento genético (Flores-Benítez *et al*., 2007).

En la producción de plantas la preocupación más importante es retener la integridad genética de los clones con respecto a la planta madre, ya que la inestabilidad genética es un problema asociado con la industria de la propagación (Pérez-Ponce, 1998). Se sabe que las técnicas de cultivo *in vitro* podrían inducir inestabilidad genética, es decir, variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981). Entre las estrategias para evaluar la variación somaclonal se encuentran la identificación fenotípica y técnicas de análisis de ADN, sin embargo, estos últimos

resultan más eficaces, ya que, algunos cambios inducidos por el cultivo *in vitro* no se pueden detectar visualmente. Cuando esto ocurre, la variación somaclonal puede evaluarse mediante técnicas de análisis de ADN (Palombi y Damiano, 2002).

El análisis genético es un complemento importante de los procesos de propagación, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de diferentes técnicas de cultivo *in vitro* en la morfogénesis de *A. salmiana* y *A. marmorata*, así como el estudio de la integridad genética de los clones obtenidos de ambas especies, usando dos tipos de marcadores moleculares: RAPDs y SSRs. Ambos marcadores han sido usados extensamente para evaluar la variación generada por técnicas *in vitro* (Agarwal *et al.*, 2008; Hashmi *et al*., 1997; Palombi y Damiano, 2002; Rahman y Rajora, 2001; Zietkiewicz *et al*., 1994).

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivos generales

- Evaluar la respuesta morfogenética de dos especies de *Agave* regeneradas *in vitro*.
- Determinar la estabilidad genética de los explantes obtenidos de cada especie.

II.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el porcentaje y peso de callo obtenido como respuesta a cuatro combinaciones de 2,4-D y BA en dos tipos de explante.
2. Evaluar el número de brotes en los callos inducidos usando cinco concentraciones de BA.
3. Evaluar el efecto de cinco concentraciones de BA en la organogénesis directa usando como explante la zona meristemática.
4. Determinar mediante marcadores RAPD y ASSR la posible variación somaclonal en los clones generados por organogénesis.
5. Evaluar el efecto de dos soluciones (nutritiva con y sin enraizador) en la etapa de adaptación de las plántulas generadas de ambas especies de *Agave.*

III. HIPÓTESIS

- Dependiendo del genotipo de Agave, de la concentración y combinación de auxina/citocinina se puede obtener una respuesta morfogenética *in vitro* diferente.
- Las plántulas generadas por organogénesis indirecta son candidatas a presentar variación somaclonal.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

IV.1 Generalidades del género *Agave*

La riqueza actual de especies de *Agave* se puede explicar en función del desarrollo de adaptaciones fisiológicas, morfológicas y ecológicas ocurridas hace 8 a 10 millones de años y que favorecieron que las nuevas especies de *Agave* colonizaran las recién formadas zonas áridas que corresponden al actual Altiplano Central Mexicano (Good-Avila y Eguiarte, 2006; Garcia-Mendoza, 2007).

Calle (1965) al analizar coprolitos mediante técnicas de C_{14} tuvo evidencias irrefutables de que los agaves fueron parte importante en la dieta de los primeros pueblos mexicanos, ya que les proporcionaban alimentos, fibras, bebida, abrigo entre otros productos (Romero, 2005). Por lo que, la alimentación con maíz, fríjol, amaranto eran complementarias con esta planta. Estos pueblos hicieron de México su centro de domesticación y diversificación mediante la selección humana, ya que los seleccionaban por sus fibras, por el aguamiel o las elevadas concentraciones de azúcares. Por todo esto los agaves no sólo tienen su máxima expresión de diversidad morfológica, filogenética y evolutiva en México, sino también cultural, ya que los seres humanos que lo han poblado han sabido aprovechar al máximo los beneficios que producen estas especies (García-Mendoza, 2007; Gentry, 1982; Valenzuela, 1997; Nobel, 1998). Algunos códices de la época colonial, como el Florentino, muestran cómo se sembraba el maguey

a la llegada de los españoles a México (Parsons y Darling, 2000). Los mexicas conocían a los magueyes con el nombre genérico de metl y no fue hasta 1753 que Linneo ubica a éstas plantas en el género *Agave*. La palabra Agave proviene de la raíz griega que significa “admirable” y describe no sólo su rara apariencia sino también su longitud y floración que ocurre sólo una vez en el ciclo de vida de la planta para después morir (Guzmán y Simpson, 2009).

Actualmente, los tallos (piñas), quiotes (inflorescencias inmaduras), bases de las hojas y flores son aún parte de la dieta en muchas regiones del país, mientras que las hojas se usan como forraje para el ganado, el aguamiel obtenido de la piña y de la base del quiote de varias especies de *Agave* (Figura 1), ha sido un complemento muy importante en la dieta de los pobladores de las zonas áridas. Asimismo, es la base de la industria de los destilados, ya que puede fermentarse para obtener pulque, concentrarse para obtener miel de maguey, destilarse para producir bebidas con un alto grado de alcohol (mezcal, tequila, sotol etc.) así como ser procesado para obtener fructosa (Domínguez-Rosales *et al*., 2008), productos a base de fibra, usados como combustible,

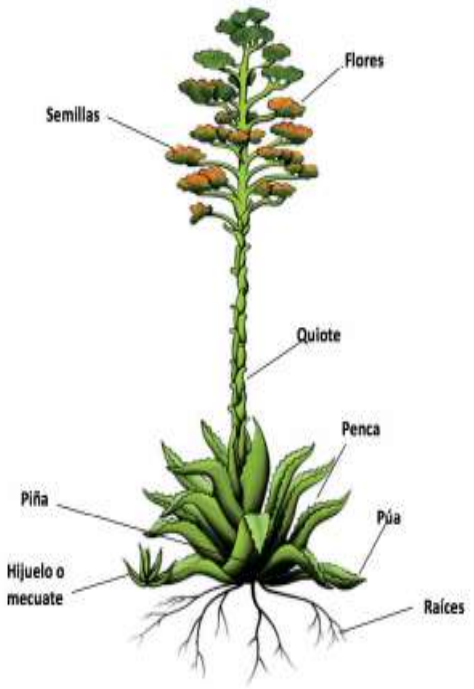

Figura 1. El maguey y sus partes (Alfonso-León, 2014).

materiales de construcción, ornato, papel y otros usos productivos y medicinales (Mendoza, 2007).

Por otra parte, los estudios etnográficos, etnohistóricos y arqueológicos han sido la base para la formación de nuevas hipótesis sobre la importancia de la complementariedad de los sistemas agrícolas, tanto en la producción anual de semillas como en la producción vegetativa (Parsons y Darling, 2000).

Los agaves están adaptados para sobrevivir en climas extremos u hostiles al soportar gran variación y fluctuación de temperaturas, y falta de agua; esta capacidad de supervivencia es en gran parte gracias al Sistema de Metabolismo Acido Crasuláceo (MAC), una alternativa fotosintética auxiliar en la vegetación desértica (Nieto *et al*., 2016; Pulques, 2014).

La NOM-059-ECOL-2001 reconoce la existencia de 18 especies dentro del género cuya supervivencia se ve severamente amenazada en estos momentos. Esta situación se debe, principalmente, a la sobreexplotación de poblaciones silvestres, el saqueo ilegal de plantas jóvenes para ser usadas como ornamentales y la destrucción de su hábitat (Domínguez-Rosales *et al*., 2008). Aunado a ello existen muchas especies que producen semillas recalcitrantes o no viables es por ello que son propagadas asexualmente, y como consecuencia la diversidad genética se ha visto reducida con la desventaja de estar sujeta a enfermedades y plagas importantes (Ramírez-Malagón *et al*., 2008).

Además, en ambientes extremos como en los que se desarrollan las especies de *Agave* y otras plantas semélparas, la propagación vegetativa, funciona como una estrategia segura para perpetuar el genotipo, ya que la reproducción sexual parece involucrar grandes riesgos y la probabilidad de éxito en el establecimiento de nuevas plántulas con frecuencia es extremadamente baja por la limitada oportunidad en espacio y tiempo. En contraste, los propágulos vegetativos tienen la ventaja de estar unidos a la planta madre durante las etapas tempranas de su ciclo de vida, un hecho que les da probabilidad mucho más alta de sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables (Abraham, 2010).

IV.2 *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck

Entre las especies de *Agave* que mayor ingreso produce en México son las pertenecientes a los magueyes conocidos como “pulqueros”, el cual es su principal producto. Este grupo está representado por *Agave americana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens* y *A. salmiana*, siendo esta última la de mayor distribución en el centro del país (Ortiz-Basurto *et al*., 2009). Estas plantas en México representan 3,681 ha con un posible valor comercial de $100 millones de dólares (Puente-Garza *et al*., 2015), sin embargo la disminución en la producción y consumo de pulque representa una seria amenaza para su transmisión y preservación (Nieto *et al*.,2016).

A. salmiana (Figura 2) tiene una amplia distribución debido a las condiciones ecológicas del Altiplano Central de México (Juárez *et al*., 2014). La presencia de varios tipos de *A. salmiana* en la zona central del país se debe a su plasticidad, infiltración genética de las formas cultivadas con silvestre (García-Valenzuela, 2011) variabilidad morfológica e intervención humana (Mora-López *et al*.,2013).

Figura 2. Agave salmiana *(CONABIO, 2005).*

El cultivo de agave pulquero es de alto valor agroecológico, para la recuperación de suelos degradados, al prosperar en cerros y lomeríos, en sistemas de monocultivo, y en cultivo asociado con leguminosas, nopal y maderables. Las plantaciones existentes de agave pulquero en los últimos años se han ido perfeccionando a través de labores agrícolas que benefician y promueven el crecimiento y desarrollo de la planta como: barbecho, paso de rastra, limpias, podas, fertilización y control de plagas (Rodríguez y Jiménez, 2016).

El maguey pulquero es una planta de la cual se pueden aprovechar todas sus partes, incluso sus plagas. Los productos de mayor valor comercial, que se pueden obtener en primera instancia son; aguamiel, pulque, gusano rojo y

blanco, así como las pencas (Narváez *et al*., 2016). El producto emblemático extraído de *A.salmiana* es el pulque. El uso que se le daba a esta bebida era meramente ritual. El barón de Humboldt sostuvo en el siglo XIX que la combinación del pulque con otros alimentos permitió a los indígenas mexicanos mantener un perfecto estado de salud (Nieto *et al*., 2016). El pulque se consideraba desde nuestros ancestros como una bebida reservada únicamente para los reyes y dioses. El origen mitológico del pulque es asociado a la diosa Mayahuel, quien habría creado el primer maguey con sus propios huesos para después enseñar el proceso de obtención del aguamiel (Nieto *et al*., 2016).

El aguamiel es la savia incolora, transparente, con sabor dulce y agradable del agave; participa en la formación de la inflorescencia. Para su extracción se elimina la yema, se raspa una cavidad en el centro del tallo y se colecta dos veces al día de manera continua por 3 a 6 meses, se pueden extraer aproximadamente 900 L por planta. El aguamiel contiene sacarosa, materias albuminoides y sales minerales como compuestos químicos más importantes. Para forraje, se estima que son extraídas 600 ton de pencas mensualmente (Silos-Espino *et al*., 2007); lo anterior representa una disminución masiva de zonas magueyeras debido a la lenta resiembra y al ciclo de propagación de la planta misma (Nieto *et al*., 2016).

La zona conocida como “Los llanos de Apan”, que abarca diferentes territorios de Hidalgo, Puebla, Morelos, Distrito Federal, Tlaxcala y Estado de México, fue la región productora de pulque más importante; para la primera parte del siglo XIX,

contaba con 250 mil ha, y aproximadamente 206 millones de plantas (Álvarez-Duarte *et al*., 2018). Los registros estadísticos del maguey pulquero son dispersos, lo que dificulta tener un panorama global de la situación. En el periodo del 2006 al 2018 el cultivo del maguey se redujo a solo cientos de ha y la producción de pulque a miles de litros (García, 2017).

Llama la atención que el pulque permanezca a pesar de haberse enfrentado a la competencia de otras bebidas alcohólicas extranjeras. La primera fue la cerveza, desde los tiempos novohispanos, pero su consumo fue fomentado de manera intensa durante el siglo XX, llegando al grado que sus productores lograran que fuera reconocida como bebida de moderación para facilitar su venta. En cambio, el pulque fue relegado y estigmatizado. En los últimos años, han aparecido cambios en la percepción de la bebida y esfuerzos por parte de diferentes organizaciones y gobiernos para dar un nuevo impulso a su preparación, distribución, venta y consumo, ya que el pulque se encuentra relegado como bebida exótica que los turistas beben con curiosidad, pero mayormente es consumido por personas pobres y marginadas (Rodríguez, 2014). La elaboración del pulque dejó de ser una fuente de ingresos importante, en los últimos años se lleva a cabo por tradición, como elemento importante de la identidad cultural de zonas pulqueras y para cubrir gastos mínimos (Erlwein *et al*., 2013).

No obstante, en la actualidad el pulque ha tenido un gran auge; en primera por el movimiento que se está llevando a cabo para darle una mayor presencia a las

bebidas nacionales, lo que nos representa como mexicanos y en segundo lugar por esta renovación que han tenido las pulcatas para entrar dentro del gusto de los jóvenes. En cuanto al cambio que ha sufrido la bebida, podemos ver que en general estos lugares rebajan el pulque con aguamiel, pues uno de los principales peros que se le suele poner es esa textura babosa que a muchas personas les desagrada. También el vender pulque curado, es decir el pulque de sabor, ha hecho que el consumo sea mayor pues ya no tiene ese sabor fuerte y tan marcado (Ot, 2017). Además el número de importaciones de esta bebida ha aumentado debido a que la consideran nutritiva, energética y gourmet, países como Francia, Estados Unidos y Alemania son grandes potencias comerciales (Adn40, 2017). Debido a lo anterior y gracias a la aplicación de la biotecnología comenzó la industrialización de la bebida envasándola, además de obtenerse otros productos con valor agregado como la inulina, miel de agave, destilado de pulque, saborizantes, productos de belleza, biocombustibles etc. (Narváez *et al*., 2016).

IV.3 *Agave marmorata* Roezl

Agave marmorata Roezl (Figura 3) es una especie endémica de México, su distribución abarca todo el Valle de Tehaucán-Cuicatlán, una reserva ecológica que se encuentra inscrita como patrimonio mundial por la UNESCO como sitio mixto (SEMARNAT, 2018). La especie *A. marmorata* (Am), debe su nombre al biólogo Roezl que lo clasificó en 1883 y viene del latín “Marmora” que significa mármol ya que generalmente crecía en betas de mármol (Palma, 2017). El

nombre común por el cual se le conoce localmente puede ser “Tepeztate” en Oaxaca o “Ptzometl” en algunas regiones de Puebla (Flores-Maya *et al*., 2015). Es una especie con rosetas largas, tallo corto, despliega de 30-50 hojas, 1.2 m de alto, 2 m de ancho, con pequeñas flores amarillas brillantes de 48 mm de longitud (Gentry, 1982). Esta especie al ser silvestre se encuentra en zonas de difícil acceso, regularmente en laderas y partes altas montañosas, se necesita realizar caminatas extensas para colectar estos ejemplares, es por ello que el valor de este tipo de magueyes es importante para los pobladores de esas zonas (CRM, 2015).

A. marmorata corre un gran riesgo de desaparecer, debido a que solamente se reproduce por semilla, y su inflorescencia es ocupada por algunas poblaciones de Oaxaca para adornar sus altares en Semana Santa. Además su periodo de maduración es la más larga de todas las especies de agave mezcalero, tarda entre 25 y 35 años de forma silvestre y aproximadamente 12 años de forma cultivada, aunado a su gran demanda comercial actualmente (Nogales, 2017).

Figura 3. *Agave marmorata* (CONABIO, 2005).

El principal uso de esta planta es para la producción de mezcal la cual requiere cosechar individuos en propagación vegetativa limitando la probabilidad de que se lleve a cabo la reproducción sexual, reduce la tasa de reproducción vegetativa (producción de hijuelos), y reduce el tamaño de poblaciones traduciéndose en impactos negativos a nivel demográfico, ambiental y probablemente genético (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013).

Las variedades como Tepeztate (*A. marmorata*), Tobalá (*A. potatorum*), Mexicano (*A. rhodacantha*), Barril (*A. karwinskii*)), Coyote (*A. americana*), Arroqueño (*A. americana*), Jabalí (*Agave convallis* Trel), Sierrudo (*A. americana* var. oaxaquensis) entre otros, a partir de los cuales se produce mezcales generalmente más exclusivos y con mayor misticismo y sentido artesanal, han tomado recientemente fuerza, ya que al detonar a un ritmo exponencial en los últimos años el mercado del mezcal, cada vez más consumidores han descubierto esta gran variedad de sabores y aromas, demandando a un ritmo acelerado el consumo de estas variedades, en su mayoría silvestres. Actualmente la obtención del mezcal es la actividad agroindustrial más importante y se hace por lo menos en 20 estados de la Republica (AGARED, 2017). En el caso particular del maguey Tepeztate, que requiere más de 20 años de maduración para el aprovechamiento de sus azúcares y entre 25 y 30 años para la producción de semilla, la cual también está limitada debido a su baja tasa de germinación, el aprovechamiento de esta variedad para la producción de mezcal al ritmo demandado se ha vuelto poco sustentable y redituable considerando su propagación por métodos tradicionales (Salinas, 2018), ya que,

para producir mezcal, el agave debe ser cosechado antes de la floración para asegurar que las piñas de la planta tengan alta concentración de azúcares (Bahre y Bradbury, 1980; Illsley *et al*., 2005). Mientras que unas especies de agave pueden reproducirse por clones, otros no, y la cosecha para la producción de mezcal reduce drásticamente el número de plantas (Jiménez-Valdés *et al*., 2010).

Oaxaca es el estado con mayor producción de mezcal, con un 93.7 % de la producción total en 2014 seguido por Zacatecas con una producción de 4.4 %. El mezcal es una bebida tradicional de México, obtenida en su mayoría por procesos artesanales brindando características organolépticas como: sabor, aroma y cuerpo muy diferente entre las especies utilizadas para su elaboración (Palma, 2017).

El Mezcal presenta un ascenso en las cumbres internacionales y sus estadísticas son prometedoras ya que han llevado a esta bebida a 42 países y comenzado su ascenso en los mercados gourmet (Ch & Gonz, 2016). El crecimiento de las exportaciones de mezcal fue altamente significativo, al pasar de 740 mil litros en 2003 a 7 millones 125 mil litros en 2018 (INEGI, 2019). En la planeación Agrícola Nacional de los Agaves tequilero y mezcalero se estima un incremento de las exportaciones de mezcal de 7.99 por ciento para el 2030 (SAGARPA, 2017).

IV.4 Cultivo de tejidos vegetales

Pérez *et al.* (1999) definieron al Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) como el conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de brotes y/o embriones somáticos a partir de cualquier célula, tejido u órgano de una planta, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas, con el objetivo de obtener clones.

Debido al incremento de la población mundial, en los últimos años se ha acentuado el interés por la biotecnología vegetal con el propósito de producir alimentos, realizar mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro*, mejorar la ingeniería genética, creación y conservación de bancos de germoplasma, y obtener metabolitos de interés comercial (Bajaj, 1991; Hurtado & Merino, 1987; Taniguchi *et al*., 2008).

Una primera aplicación del CTV es la propagación masiva, técnica que permite obtener una gran cantidad de plantas en tiempos y espacios reducidos. Esta metodología se ha desarrollado ya para varias especies de *Agave*, y ha demostrado ser más eficiente que cualquiera de los métodos convencionales de propagación que se maneja en este grupo de plantas (Domínguez-Rosales *et al*., 2008; Enríquez del Valle *et al*., 2005; Ramírez-Malagón *et al*., 2008).

IV.4.1 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis implica la formación de órganos a partir de células somáticas de los tejidos u órganos aislados. Puede ser indirecta si existe una etapa intermedia y se forma a partir de callos o directa sin la formación de callo. En la morfogénesis indirecta, las células y/o los tejidos se desdiferencian para formar callo. Si el callo se disgrega, se originan grupos de células (agregados), y/o células aisladas (cultivos en suspensión). La inducción de los procesos morfogénicos se inducen fundamentalmente mediante el uso de reguladores de crecimiento como auxinas y/o citocininas en el medio nutritivo (Alonso, 2002; Pierik, 1990).

La propagación clonal *in vitro* resulta de realizar continuas divisiones celulares de tipo mitosis y la organogénesis a partir de tejido somático, yemas o meristemos (Bellec y Faure, 2003). Este proceso de regeneración somática en las plantas reside en la totipotencia que poseen las células que las conforman, es decir, que cualquier célula posee la información necesaria para formar un nuevo individuo (Valenzuela-Sánchez, 2006).

Además, las células que fungen como progenitores son estimuladas para que se lleve a cabo de forma acelerada una serie de divisiones celulares que tienen como consecuencia la formación de meristemoides (Núñez-Palenius, 1999; Schwarz y Beaty, 2004). Los meristemoides son caracterizados como agregados de células con características similares a las células meristemáticas y que en un

principio cuentan con la plasticidad necesaria para diferenciarse en primordios (Schwarz y Beaty, 2004).

El punto crítico en este proceso es el momento en que una célula dentro del explante, usualmente parenquimatosa y vacuolada, comienza a dividirse para dar lugar al grupo de células que componen el meristemoide. A este proceso en concreto se le da el nombre de inducción (Pérez *et al*., 1999).

Existen varios factores a considerar para la manipulación exitosa de la morfogénesis, entre ellos se menciona el tamaño y la edad fisiológica de los explantes, pues se ha comprobado que los tejidos juveniles presentan mayor aptitud para la morfogénesis que los tejidos que proviene de órganos adultos o senescentes. También la luz, temperatura, consistencia del medio de cultivo, el pH y los RCV desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta (Ramírez-Malagón *et al*., 2008).

IV.4.2 Organogénesis

La organogénesis constituye una de las posibles vías morfogénicas para la diferenciación de plantas de novo. Se considera la base fundamental de la multiplicación vegetativa o formación de nuevos meristemos y de la producción de plantas *in vitro*. La producción de órganos puede ser directa o indirecta (George, 1993).

Aun cuando la organogénesis es un proceso muy utilizado para la propagación de plantas, es muy poco lo que se sabe acerca de los fenómenos fisiológicos, bioquímicos y genéticos que lo hacen posible (Domínguez-Rosales *et al*., 2008).

Las células que asumen procesos de organogénesis incrementan su actividad metabólica, su intensidad de respiración y consumo de carbohidratos (Bellec *et al*., 2003), es por ello que el medio de cultivo debe componerse por elementos minerales (macro y micronutrientes), compuestos orgánicos como vitaminas, fitorreguladores y fuentes de carbono (Valenzuela-Sánchez, 2006).

IV.4.2.1 Organogénesis directa

Consiste en la formación de raíces o brotes adventicios en los explantes cultivados *in vitro*, que puede ocurrir en forma directa a partir de células, tejidos u órganos vegetales iniciadores del cultivo *in vitro* (Valenzuela-Sánchez, 2006).

En este tipo de organogénesis, la formación de brotes se realiza directamente en el explante inicial sin la previa formación de callo. La ausencia de callo en los explantes da un alto porcentaje de seguridad de que los brotes producidos sean idénticos (clones) a la planta madre, siendo por este motivo un método de propagación comercial adecuado (Guerrero, 2010).

Los brotes adventicios se originan a partir de células epidérmicas del explante, sin embargo, también pueden originarse a partir de células subdermales. En

algunas ocasiones es frecuente la formación de callo durante la formación de brotes adventicios, por lo que es necesario hacer ajustes en las concentraciones de RCV para evitarlo, ya que su presencia puede dar lugar a la producción de cambios genéticos en los brotes (Streer, 1979;Vasil y Vasil, 1994).

IV.4.2.2 Organogénesis indirecta

Cuando, a partir de la siembra, se observa la proliferación de células en forma desordenada y sin ninguna función predeterminada, se iniciará la producción de callos a lo que se denomina organogénesis indirecta (Picca y Carrera, 2004; Valenzuela- Sánchez, 2006).

La utilidad de generar callogénesis destaca en la posibilidad de realizar estudios citológicos, así como permitir el enfoque de un mejoramiento en cuanto a algunas características del cultivo a micropropagar (Al-Zahim *et al*., 1999).

La variabilidad genética entre y dentro de los cultivos se refleja primero en la morfología de los callos. Algunos autores (Petiard y Bariaud, 1985; Wareing y Chalabi, 1985) opinan que este fenómeno puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tiene lugar en los cultivos *in vitro*. Otros indican que también pueden ser causadas por alteraciones o cambios de factores epigenéticos originados por la forma en que se establecen los cultivos.

Hay estudios donde se observa que callos establecidos a partir de diferentes órganos pero de la misma planta varían en apariencia y presentan características únicas (Holden *et al.*, 1988; Petiard y Bariaud, 1985) Pero más aún, callos procedentes de un mismo explante también difieren en su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos (Calva y Ríos, 1999; Lindsey y Yeoman, 1983).

A lo largo del tiempo se han creado protocolos usados para la propagación masiva de especies de *Agave* mediante los dos procesos de regeneración *in vitro* (organogénesis directa e indirecta) como las descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Investigaciones realizadas en diversas especies de *Agave* mediante organogénesis indirecta (OI) y directa (OD).

Especie	Tipo de explante	OD/OI	Número de brotes/explante	Fuente
A. arizonica	Bulbilos	OI	5-10	(Powers & Backhaus, 1989)
A. cantala	Estolones	OI	12	(Binh,1990)
A. fourcroydes				
A. sisalana				
A. tequilana Weber, var. Azúl	Brotes apicales	OD	12	(Ramírez-Malagón *et al.*, 2008)
A. salmiana sub. *crassipina*			3	
A. duranguensis			6	
A. oscura			13	
A. pigmea			6	
A. vistoria-reginae			6	
Especie	**Tipo de explante**	**OD/OI**	**Número de brotes/explante**	**Fuente**
A. parrasana Beger.	Proliferación de brotes axilares	OD	48.6	(Santacruz-Ruvalcaba *et a*l., 1999)
A. sisalana	Rizomas	OI	12	(Das, 1992)

A. salmiana Gentry	ZM de tallo	OD	20.3	(Silos-Espino *et al*., 2007)
Agave sisalana	Base de hoja y rizoma	OI	23.3	(Hazra *et al*., 2002)
Agave atrovirens	Base de la hoja	OI	15	(Romero, 2005)
A. tequilana Weber	ZM basal de tallo	OI	20-30	(Valenzuela Sánchez, 2006)
A. americana var. oaxaquensis	ZM basal de tallo	OD	5-12	(Arreola *et al*.,2016)
A. marmorata	ZM basal de tallo	OD	41	(Jiménez & Rodríguez De la O, 2018)

Todos los estudios anteriores demuestran que cada especie tiene una determinada respuesta a los diversos factores involucrados en el cultivo *in vitro*.

IV.5 Reguladores de crecimiento vegetal utilizados en la micropropagación

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Gabriel, 2017).

Los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro* (Lara, 2005).

A medida que se fueron identificando un mayor número de RCV y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes de las plantas, sino que tales respuestas dependen de la especie, del explante, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones

entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los RCV sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano en particular (Salisbury y Ross, 1994). Los RCV más utilizados en los cultivos *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y citocininas (Pérez *et al*., 1999).

IV.5.1 Auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos derivados del triptófano, sintetizado por lo general en los ápices: ejercen un control sobre la replicación del ADN y participan activamente en la organización de los procesos vegetales; incluyendo la regulación de las proporciones del crecimiento diferencial, enraizamiento, partenocarpia, tropismo, abscisión, regulación de los procesos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica (Condemarín *et al*., 2007; Lara, 2005; Salisbury y Ross, 2000).

Una de las auxinas más efectivas para la formación de callogénesis en especies de *Agave* es el 2,4-D, mientras que no es requerida para la inducción de brotación en la mayoría de estas especies como: *A. parrasana* (Caraballo y Cruz, 2010), *A. fourcroides* (Santacruz-Ruvalcaba *et al*., 1999), *A. salmiana* (Puente-Garza *et al*., 2015), donde se menciona que la adición de 2,4-D inhibió la proliferación de brotes. Por otro lado algunas especies como *A. arizonica* y *A. cantala* (Binh *et al*., 1990), *A. tequila* (Powers y Backhaus, 1989), *A. atrovirens* y *A. victoria-reginae* (Ramírez-Malagón *et al*., 2008; Robert y Scorer, 1987; Romero, 2005) requieren

concentraciones moderadas de diversas auxinas como 2,4-D, IBA (ácido 4-indol-3-butírico), AIA (ácido indolacético) y ANA (ácido1-neftalenacético).

IV.5.2 Citocininas

Las citocininas pueden estimular la división celular o citocinesis. Casi todas las citocininas naturales son derivados de la adenina. Como sucede con los demás reguladores de crecimiento, las citocininas tienen amplios efectos regulatorios que pueden promover la división celular, la iniciación del crecimiento en raíces laterales; inhiben la elongación de tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, actúan en el retraso de la senescencia, en la dormancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis (Kende *et al*., 1997).

Una de las citocininas más exitosas en el cultivo *in vitro* de *Agave* es la BA (bencilaminopurina) la cual es importante para la producción masiva de brotes como es el caso de *A. parrasana* Berger (Santacruz *et al*., 1999). Domínguez-Rosales *et al*. (2008) probaron cinco citocininas en la inducción de brotes de *A. cupreata* Trel. y Berger, *A. difformis* Berger, *A. karwinskii* Zucc., *A. obscura* Schiede y *A. potatorum* Zucc obteniendo los brotes más vigorosos con BA.

IV.6 Explante

El termino explante se define como un fragmento de una planta (célula, tejido u órgano; el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.), que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo (Gabriel, 2017; Roca *et al*., 1991).

Se debe elegir el tejido del que se quiere partir para la micropropagación; así como, la forma de diferenciación y de regeneración de órganos (Yah-Chulim, 2011). La mejor opción no es siempre la que mayor número de brotes produce (Qureshi y Saxena, 1992). La gran mayoría del cuerpo de la planta deriva de las zonas meristemáticas que son activas durante el crecimiento y desarrollo de éstas (Jacobs, 1997; Kerstetter y Hake, 1997). Las células meristemáticas se distinguen de otras células por su tamaño relativamente pequeño, citoplasma denso, forma isodiametrica, pared celular fina, mínima vacuolación y un gran núcleo (Vargas, 2005). En los cultivos *in vitro*, este tipo de células se encuentran en la periferia de los callos como masas, lo que produce una gran variabilidad en la expresión genética entre la población celular de esos cultivos. También es necesaria su presencia para poder generar una planta a partir de un cultivo *in vitro* (Vargas, 2005).

Se ha comprobado que los tejidos juveniles presentan una mayor aptitud para la morfogénesis que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes (Domínguez-Rosales *et al*., 2008; Picca *et al*., 2004), ya que al tener un crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explante (Vargas, 2005).

Aunque en una misma planta se puede encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, la diferencia entre ellos radica en su actividad y la presencia o no de estructuras sexuales (Calva y Rios, 1999; Seabrook, 1980; Streer, 1979).

Se ha mencionado que cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos, sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos (Picca *et al*., 2004).

IV.6.1 Desinfección en el cultivo *in vitro*

Al igual que en otras especies el cultivo *in vitro* de *Agave* se ha enfrentado a varias problemáticas entre las que se encuentra el bajo potencial de regeneración, la hiperhidricidad de los explantes y la presencia de contaminantes endofíticos o asociados a errores humanos durante la transferencia de los cultivos (Kulus, 2014). La obtención de un material estéril es difícil, pese a las precauciones tomadas, el 95% de los explantes se contaminarán si no se tiene una adecuada desinfección del tejido (Romero, 2005).

La desinfección del material a utilizar en la propagación es de vital importancia, ya que en ella reside el éxito de los diferentes procesos a obtener como

callogénesis u organogénesis bajo condiciones controladas y libres de patógenos que pudieran interferir en dicho proceso (Romero, 2005).

Entre los contaminantes microbianos, las bacterias causan pérdidas elevadas en el cultivo *in vitro* de plantas (Leifert y Waites, 1992). Aunado a ello se debe de tener en cuenta el tipo de explante del cual se parte ya que si estos provienen de campo la probabilidad de la contaminación por virus, bacterias, levaduras y hongos filamentosos es elevada (Niubó *et al*., 2004). El uso de antibióticos incorporados al medio de cultivo es una de las alternativas para disminuirlas, aunque su aplicación se ve restringida debido a sus posibles efectos fitotóxicos sobre el material vegetal (De Robertis, 2006; Fang y Hsu, 2012).

En *A. fourcroydes* el uso de los antibióticos como Ticar y Cefotaxima en la propagación *in vitro* permito reducir las pérdidas por contaminación bacteriana (Abreu *et al*., 2016). El empleo de preventivos merma la probabilidad de contaminación en el medio de cultivo así como la buena desinfección del explante a utilizar.

En años recientes ha crecido el interés en la preparación y el estudio de las nanopartículas, las cuales pueden formarse a partir de diferentes metales y tener diversas aplicaciones. Las nanopartículas de plata (Np-Ag) son ampliamente utilizadas en las ciencias médicas. Son materiales nanoestructurados cuya base son las sales de plata (Wu *et al*., 2008).

El efecto antibacteriano de las sales de plata es conocido desde la antigüedad y actualmente la plata está siendo utilizada para inhibir el crecimiento bacteriano en una variedad de aplicaciones, incluyendo la agronomía (Souza-filho *et al*.,2008).

IV.7 Aclimatación

Durante el cultivo *in vitro*, las plántulas son expuestas a condiciones ambientales disímiles al ambiente externo. La atmósfera interna se caracteriza por presentar una considerable variación en la concentración de CO_2, humedad relativa alta, temperatura constante e intensidad lumínica baja. A su vez el medio de cultivo compuesto por concentraciones elevadas de azúcares, sales y RCV, sumado a la ausencia de microorganismos, generan anormalidades morfológicas, anatómicas y fisiológicas que las plantas deberán corregir cuando son trasferidas al ambiente externo. Este periodo de adaptación es llamado fase o etapa de aclimatación (Picca *et al*., 2004).

La aclimatación de las plantas es una etapa decisiva, debido al estrés al que son sometidas las plantas transferidas, ya que presentan características morfológicas y funcionales de acuerdo a las condiciones favorables que predominan, por lo que no están preparadas para enfrentar los cambios bruscos que implica su aclimatización *ex vitro* durante la que se debe lograr su supervivencia (Arreola,

2016). Varios autores (Abreu *et al*., 2007; Martínez *et al*., 2005; Monja-Mio *et al*., 2015) coinciden al señalar que dentro de las características que presentan está su baja capacidad fotosintética debido a los bajos contenidos de pigmentos ya que los cloroplastos presentan granas desorganizadas; ausencia de cutículas cerosas, estomas pocos funcionales debido a la alteración en la forma de las células oclusivas, con distribución diferente a la normal, ineficiencia de tejidos de sustento debido a la reducida presencia de colénquima y esclerénquima, absorción y transporte de agua ineficiente debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote, que difieren de aquellas plantas que se obtienen mediante métodos convencionales. Lo anterior se puede superar al someter las plantas a un proceso de aclimatación en invernadero y vivero durante la cual las plantas micropropagadas desarrollan estructuras resistentes a las condiciones ambientales *ex vitro* (Raymundo *et al.*, 2016).

Durante la aclimatación hay condiciones importantes a considerar; su establecimiento dentro de invernadero, usar sustrato con buena retención de humedad, mantener la temperatura en el intervalo de 15 a 28°C, cambiar de manera gradual (90%) a menor (40-60%) humedad relativa en el transcurso de 30 a 50 días, incrementar la radiación solar de 50% al inicio a radiación solar plena y abastecimiento adecuado de nutrimientos (Arreola *et al*., 2016).

El equipamiento necesario estará sujeto a la especie, pudiendo utilizarse desde túneles de polietileno para plantas que posean un elevado control en la

transpiración como *Malus pumila* o *Agave tequilana*. En todo momento deberá realizarse un riguroso control fitosanitario empleándose antibióticos, fungicidas e insecticidas (Picca *et al*., 2004).

IV.8 Variación Somaclonal

El objetivo del CTV es que todas las plantas regeneradas de una célula o tejido tengan una constitución idéntica a la planta madre. Sin embargo, el comportamiento celular normal es el resultado de una compleja cascada de programas genéticos que son sensibles a la disrupción por estrés biótico y abiótico, pudiendo involucrar procesos mutagénicos durante el establecimiento del explante, inducción de callo, formación de embriones o durante la formación de órganos. Por estas vías es posible obtener variación somaclonal de origen nuclear y /o citoplasmático (Chen & Chen, 1998; Larkin, 2004).

La VS se refiere a las diferencias que ocurren *in vitro* en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como en plantas regeneradas de los mismos (Sánchez y Jiménez, 2009), posteriormente estas diferencias son reflejadas en las plantas regeneradas (Gutiérrez-Mora *et al*., 2003). La VS generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Anu *et al*., 2004; Brar y Jain, 1998; Kaeppler *et al*., 2000; Larkin y Scowcroft, 1981; Navarro y Perea, 1996; Pierik,1997; Sahijram *et al*., 2003). Cuando la VS es heredable se le asocia con rearreglos cromosomales, deleciones y mutaciones (Noro *et al*.,2007; Sánchez-

Teyer *et al*., 2003). Por otro lado, cuando la VS es epigenética, puede ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, reversible y no heredable (Kaeppler *et al*., 2000; Jain, 2001; Pierik., 1997), que está asociado a alteraciones en los patrones de metilación del ADN (Kubis *et al*.,2003).

Además de la tasa normal de variación, propia de las células vegetales en condiciones normales, formando parte de un tejido, en un órgano y planta intactos, hay factores externos, propios del cultivo *in vitro*, que puede inducir acumulación de variaciones genéticas y epigenéticas, que se manifiestan en el fenotipo. Algunos factores externos son: (1) Método de cultivo *in vitro* y patrón de desarrollo, (2) edad del cultivo y número de subcultivos, y (3) algunos componentes del medio de cultivo (Sánchez y Jiménez, 2009).

El patrón de desarrollo que sigue un explante durante su morfogénesis *in vitro* es un elemento clave que se relaciona con la VS. Por ejemplo, cuando un tejido altamente diferenciado pasa por una etapa de desdiferenciación con una alta tasa de división celular, se puede generar mayor VS que cuando ocurre un desarrollo directo hacia la regeneración a partir de yemas apicales, axilares y embriones (Bray y Jain, 1998; Valenzuela, 2006).

Entre los componentes del medio de cultivo los RCV, principalmente aquellos con naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN, causando así cambios epigenéticos (Bray y Jain, 1998; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Sahijram

et al., 2003). Entre los compuesto auxínicos se encuentra el 2,4-D, el cual es considerado una fuente de inestabilidad genética (Carballo *et al*., 2010).

Las condiciones fisicoquímicas y nutricionales actúan sobre los cultivos para orientar la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación que proporciona a los cultivos características propias y únicas, aun cuando éstos provengan de una misma planta y todavía más, de un mismo explante (Vargas, 2005).

La VS puede ser utilizada como herramienta para inducir variabilidad genética y, en el mejor de los casos, obtener características agronómicas deseables; resistencia a enfermedades, mejora en la apariencia de plantas, flores, frutos, tamaño, sabor, fragancia y presencia de metabolitos de interés (De Robertis, 2006).Tal es el caso de *A. tequilana* en los que se lograron individuos resistentes a *Erwinia carotovora* y a *Fusarium oxysporum* (Rodríguez-Garay *et al*., 2015). Sin embrago, en algunos casos la VS es indeseable, cuando el objetivo es mantener la uniformidad (Ahloowalia, 1998; Bray y Jain, 1998; Sahijram *et al*., 2003).

Yang *et al*. (1999) observaron VS en muchos tipos de plantas regeneradas a través de técnicas de cultivo *in vitro*, lo que ha obligado a emplear sistemas de detección molecular para la identificación de estas variaciones y conocer el grado de estabilidad genética de las plantas propagadas (Eisenstein, 1990; Gibbs, 1990).

La VS puede ser caracterizada por diversos tipos de marcadores:

- Morfológicos: tales como el estudio del cariotipo (análisis citológico), tamaño, color de las flores, formas de hoja, etc. (Ahloowalia y Sherington, 1985; Osuji *et al*.,1997).
- Patrones isoenzimáticos: se basan en la presencia de isoformas de enzimas específicas, que tienen la misma actividad, pero con diferente estructura molecular (Chen *et al*., 1998).
- Los basados en las proteínas de reserva de las semillas (Maddock *et al*., 1985).
- Basados en el ADN (Picca *et al*., 2004).

Como se puede observar, varias estrategias están disponibles para detectar variaciones genéticas, incluyendo identificación fenotípica y técnicas de análisis de ADN. Sin embargo, al utilizar los rasgos morfológicos y fisiológicos requerimos realizar observaciones extensas de las plantas hasta la madurez, ya que, algunos cambios inducidos por el cultivo *in vitro* no se pueden observar, la diferencia estructural en el producto genético no siempre altera su actividad biológica hasta tal punto que éste se refleje en el fenotipo. Cuando esto ocurre, la variación somaclonal puede evaluarse mediante técnicas de análisis de ADN (Palombi y Damiano, 2002).

IV.8.1 Marcadores moleculares

Un marcador molecular es definido como un segmento particular de ADN que es representativo de las diferencias a nivel del genoma. Los marcadores moleculares pueden o no estar correlacionados con la expresión de un rasgo en el fenotipo además ofrecen numerosas ventajas sobre las alternativas convencionales basadas en el fenotipo, ya que, son estables y detectables en todos los tejidos independientemente del crecimiento, diferenciación, y el desarrollo o estado de la célula no se ve afectado por el ambiente, pleitropías o efectos epistáticos (Agarwal *et al*., 2008). Para su aplicación, el ADN extraído es digerido por enzimas específicas (Jaligot *et al*., 2004), o bien, se amplifican utilizando primers definidos, o combinando ambos procedimientos (Prado *et al*., 2007; Sahijram *et al*., 2003). Los resultados son visualizados como patrones de bandas en un gel (Al-Zahim *et al*., 1999; Jaligot *et al*., 2004). Como se mencionó anteriormente, los marcadores moleculares se han utilizado principalmente en estudios de diversidad genética, pero en algunos casos también para el estudio de estabilidad genética en el cultivo de plantas *in vitro* (Sahijram *et al*., 2003).

Las técnicas básicas en marcadores moleculares pueden clasificarse en tres categorías (Fernández *et al*., 2002; Picca *et al*., 2004):

- Técnicas no basadas en PCR o basadas en hibridación: RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción).
- Técnicas basadas en PCR: RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), SSR (Secuencias simples repetidas)

- Mixtos: AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados)

Los métodos basados en la técnica de PCR identifican perfiles únicos de fragmentos de ADN al variar la naturaleza del oligonucleótido iniciador y las condiciones de su alineamiento (Yah-Chulim, 2011).

IV.8.2 PCR

En 1983, Kary Mullis, investigador de la compañía Cetus, diseña y patenta un método para la amplificación de secuencias específicas de ADN, al que se le denominó PCR, siglas de reacción en cadena de la polimerasa en inglés (Mullis, 1990).

La PCR es una técnica enzimática que permite amplificar *in vitro* un número teóricamente limitado de copias de una secuencia de ADN conocida, gracias a la repetición cíclica de tres pasos o reacciones simples en las que solo varía la temperatura de incubación (Eisenstein, 1990). Para su realización se requieren reactivos básicos que se someten a diferentes cambios cíclicos de temperatura. Estos son: la muestra o molde de ADN a amplificar, dos oligoncleótidos, llamados cebadores o primers, cada uno de ellos complementario a cada una de las hebras del ADN molde al que flanquean, con una corta distancia entre ellos; una cantidad abundante de los cuatros desoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y una enzima (ADN polimerasa), que se encarga del proceso de síntesis

de las nuevas copias de DNA. El proceso se realiza mezclando los productos antes mencionados en un tubo Eppendorf de 0.2 ml, al que sometemos a una serie de ciclos en los que varía la temperatura de incubación (Eisenstein, 1990; Gibbs, 1990). Cada ciclo consta de tres pasos o reacciones:

1. Desnaturalización del ADN muestra bicatenaria en los que se separan las dos hebras complementarias por calentamiento de las mismas a 95°C.

2. Renaturalización/acoplamiento/hibridación/alineación o unión de los cebadores a las secuencias complementarias del ADN muestra por descenso de la temperatura (entre 37°C y 60°C).

3. Polimerización, síntesis o extensión, en el que la temperatura (72°C) se adecua para que pueda actuar la enzima y copiar la hebra de ADN molde mediante la adición al extremo 3´ del cebador de los distintos deoxinucleótidos según las reglas de la complementariedad, sintetizándose el nuevo ADN en la dirección 5´ y 3´.

Estos pasos se repetirán cíclicamente, de tal manera que después de cada ciclo habrá un crecimiento exponencial de las copias de ADN, un incremento final de 2^n, donde n es el número de ciclos (Gibbs, 1990; Oriola, 1990).

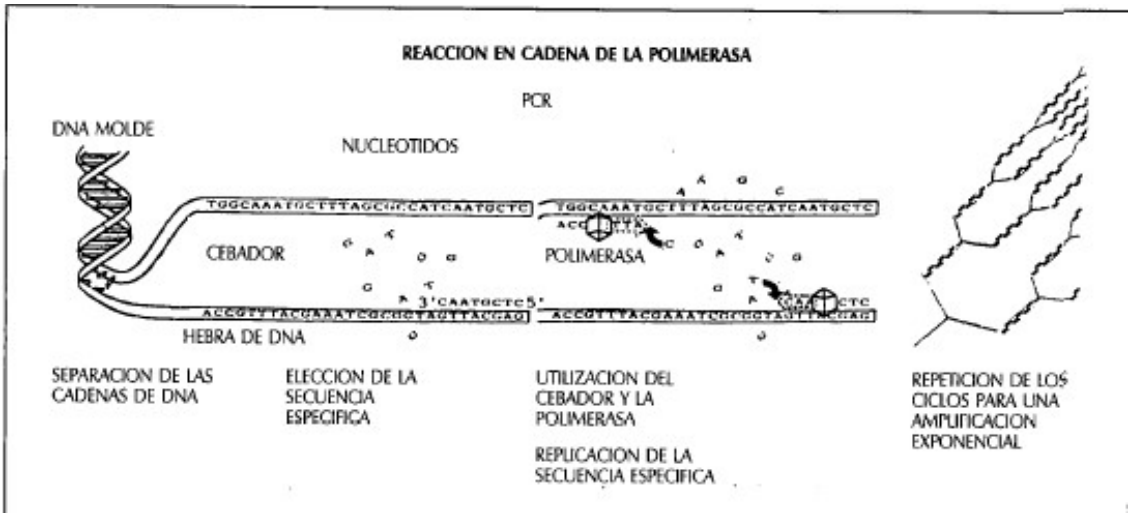

Figura 4. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En un primer paso el segmento de DNA a amplificar se desnaturaliza por calor, después los cebadores elegidos hibridan con sus regiones complementarias y comienzan la síntesis de nuevas cadenas por la Taq polimerasa. De esta manera se incrementa de manera exponencial el número de copias de la secuencia enmarcada por los dos cebadores (Sociedad Española de Nefrología, 1995).

La utilización de la Taq polimerasa favoreció enormemente la automatización de los procesos de la PCR y actualmente existen en el mercado aparatos como termocicladores, que permiten realizar de forma cómoda todo el proceso. El termociclador puede programarse según las necesidades de cada caso (Saiki y Gelfand, 1988).

IV.8.2.1 Los reactivos

- Inicialmente, la enzima utilizada en la PCR era un fragmento de ADN polimerasa de *E. coli*, denominado fragmento de Klenow, cuya temperatura óptima de reacción es de 37°C. Esto obliga a añadir una alícuota de enzima fresca tras cada desnaturalización, pues durante esta temperatura, se eleva a unos 94°C durante casi un minuto y la enzima pierde su actividad (Avila *et al.*, 1993). Este problema se solucionó en 1988

con la comercialización de DNA polimerasa procedente de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus*, que vive a temperaturas de 70-75°C en fuentes termales. La Taq polimerasa, como se le denomina, presenta una temperatura óptima de actuación entre 75-80°C, siendo más resistente al calor, de forma que tras 50 ciclos a las condiciones citadas conserva el 65% de su actividad (Saiki y Gelfand, 1988).

- Los cebadores oligonucleotídicos: para poder sintetizar copias de un fragmento de ADN debemos previamente conocer al menos la secuencia de los dos extremos del fragmento. Conocidas estas secuencias, se sintetizan los dos oligonucleótidos, cebadores o primers, que serán complementarios a cada flanco de cada una de las hebras en sentido 5´-3´o antisentido. A partir de aquí, la enzima podrá llevar acabo su actividad de síntesis, siempre desde el extremo 3´término del cebador y en la dirección 5´-3´ (Eisenstein, 1990; Oriola, 1990). Los cebadores se añaden a la reacción en un exceso molar sobre el ADN molde, de manera que la formación del complejo cebador-ADN molde se vea favorecida sobre la reasociación de las dos hebras del ADN molde en el segundo paso del ciclo cuando desciende la temperatura (Avila *et al*., 1993).

- Aparte de los ya citados, cebadores y enzimas, se debe incluir en el tubo de reacción los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos y $MgCl_2$ en un tampón

adecuado, normalmente Tris-HCl, pH 8.4, a temperatura ambiente y, por supuesto, la muestra del ADN que se quiera amplificar (Avila *et al.*, 1993).

IV.8.3 Electroforesis

Método que utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas (ya sea de proteína, isoenzimas o ácidos nucleicos como ADN o ARN) de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica (Berkelman *et al.*, 1998). De acuerdo con (De Robertis, 2006) cuando una mezcla de moléculas ionizadas con carga neta, son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta.

El movimiento de las moléculas dentro de dicho campo eléctrico también está gobernado por dos fuerzas adicionales; por un lado la fricción con el solvente, que dificultará el movimiento originando una fuerza que se opone y por otro lado la difusión, donde las moléculas se mueven en forma aleatoria debido a que poseen energía cinética propia (Krause *et al*., 1996). La suma de estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, por lo que se requiere un medio que oponga resistencia a dichos movimientos y se logre así un corrimiento estable, usualmente se utiliza un gel que consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, lo que provoca

consecuentemente que la migración electroforética de las moléculas sea más lenta y homogénea (Berkelman *et al*., 1998).

Uno de los geles más utilizados son los geles de agarosa, los cuales están hechos a base de un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 ºC y formar un gel semisólido al enfriarse (De Robertis, 2006).

Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas que retarda el paso de las moléculas y posee la capacidad de separar moléculas grandes de alrededor 20,000 nucleótidos (Krause *et al*., 1996; Peschke y Phillips, 1992), por lo que es muy funcional en el análisis electroforético de productos derivados de PCR (Berkelman *et al*.,1998).

IV.8.3.1 RAPD

Esta técnica fue descrita por primera vez en 1990 por dos grupos de investigadores independientes (Yah-Chulim, 2011). La base de la técnica RAPD es la amplificación diferencial por PCR de ADN genómico. Deduce los polimorfismos del ADN producidos por reordenamientos o eliminaciones en o entre sitios de unión de cebador oligonucleotídico en el genoma usando secuencias aleatorias cortas de oligonucleótidos (principalmente 10 pares de

bases). Los fragmentos de ADN son separados según su movilidad electroforética y visualizados en un gel de agarosa o poliacrilamida (Williams *et al*., 1991). Como el enfoque no requiere conocimiento previo del genoma que se analiza, puede emplearse en todas las especies utilizando cebadores universales (Agarwal *et al*., 2008).

El principal inconveniente del método es que el perfil es dependiente de las condiciones de reacción, por lo que puede variar, dentro de dos laboratorios diferentes y como varios loci discretos en el genoma se amplifican por cada cebador, los perfiles no pueden distinguir individuos heterocigotos de individuos homocigotos (Bardakci, 2001). Durante la fase de alineamiento de la reacción de PCR-RAPD, el iniciador arbitrario se unirá a los sitios de la secuencia complementaria en el ADN molde desnaturalizado. Si dos moléculas se alinean en cadenas opuestas, con la orientación apropiada y con una distancia amplificante, entonces será amplificado un fragmento de ADN (Figura 5). El polimorfismo entonces será detectado como ausencia o presencia de bandas de un fragmento particular (Enrech, 1999). Los polimorfismos RAPD resulta de la diferencia de secuencias en uno o ambos sitios de unión de los iniciadores, los cuales evitan el alineamiento de la secuencia molde. Otras fuentes de polimorfismo RAPD puede incluir diferencias de apenas un par de bases (mutaciones puntuales) que son suficientes para causar complementariedad del iniciador en el sitio de iniciación; deleciones o inserciones adyacentes en el sitio de iniciación puede provocar la acción de la Taq polimerasa, por lo que los

marcadores RAPD tienen naturaleza binaria, el segmento amplificado está presente o no (González *et al*., 2004).

La ausencia de variación usando marcadores RAPD ha sido reportada en varios casos (Figura 5) como en brotes de *Bleta purpurea* (Lam.) (Yah-Chulim, 2011), en la micropropagación de *Vitis* spp.(Alizadeh y Kumar, 2009). Por el contrario, la presencia de polimorfismo con estos marcadores se encontró en plantas regeneradas por embriogénesis somática de cebolla (*Allium sativum* L.) (Al-Zahim *et al*., 1999). En el caso de dátil (*Phoenix dactylifera*), la mejor técnica para la detección de VS fue RAPD, frente a los RFLP y la técnica de AFLP (Kunert *et al*., 2017).

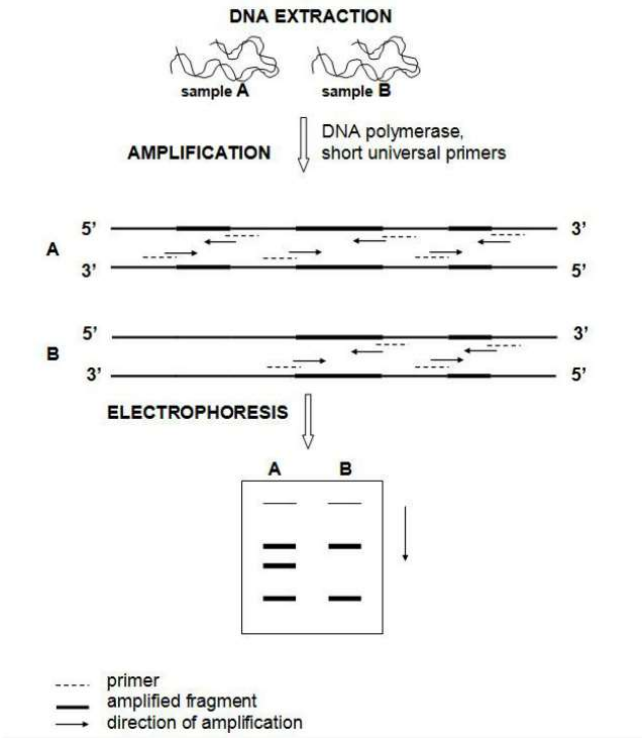

Figura 5. Pasos de la técnica RAPD (Pasqualone, 2013).

IV.9 SSR

Los microsatélites o SSR son marcadores genéticos muy populares debido a su alta abundancia, enorme extensión de diversidad alélica y la facilidad de evaluar el tamaño de la variación SSR por PCR con pares de cebadores flanqueantes (Agarwal *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*,2009). La interpretación de los polimorfismos está basada en la variabilidad del número de repeticiones y, en consecuencia, por el tamaño de los fragmentos amplificados (Aravanopoulos, 2003; Picca *et al.*, 2004). La reproducibilidad de los microsatélites es tal que pueden ser utilizados por diferentes laboratorios de investigación para producir datos consistentes (Saghai *et al.*, 1994). Esta técnica permite detectar diferencias hasta de una base, que corresponde al mínimo de longitud de un polimorfismo (Picca *et al.*, 2004), los microsatélites típicos constan de 10-30 copias de una repetición que usualmente no son superiores a 4 pb de longitud, por lo tanto son fácilmente sintetizados en el proceso de la PCR, generando diferencias de peso molecular que son traducidas en polimorfismo (Hayden y Sharp, 2001).

La forma en que detectan el polimorfismo los marcadores ASSR es a través de la amplificación por PCR del microsatélite (Figura 6) este se fija a través de los oligonucleótidos complementarios (ancla) (Karp *et al.*, 1997).

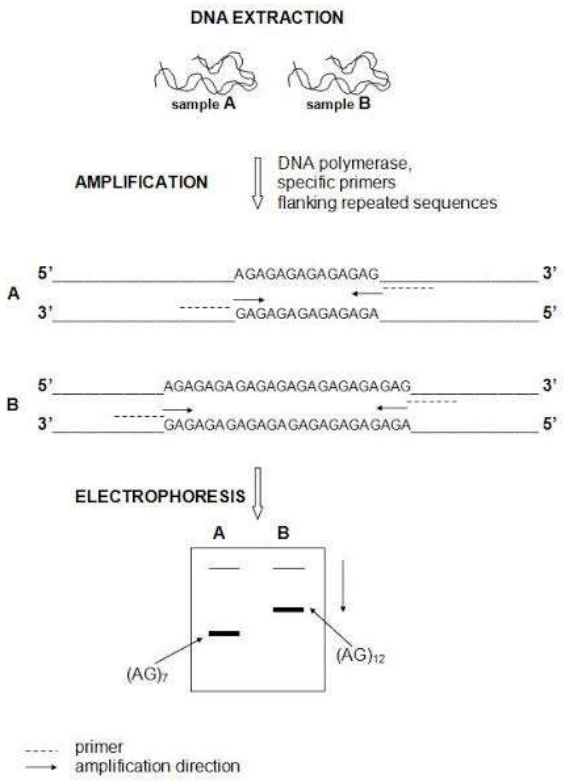

Figura 6. Pasos de la técnica SSR. La imagen considera un microsatélite con un dinucleótido unido a la base (AG)n (Pasqualone, 2013).

Los microsatélites están distribuidos a través de todo el genoma, por lo que el espaciamiento que existe entre ellos es lo que origina las bandas polimórficas, así pues la PCR tipifica el polimorfismo de longitud de los microsatélites, es decir, el número de copias repetidos en tándem, a una distancia menor a 300 Pb (Zietkiewicz *et al*.,1994).

Los SSRs han sido utilizados para determinar VS en la especie arborescente *Populus tremuloides*, donde se evaluó la fidelidad clonal *in vitro* de las plantas generadas (Rahman y Rajora, 2001), más ejemplos de su uso se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Investigaciones realizadas con RAPD y SSR para la detección de variación somaclonal.

TM	Especie	Objetivo	Resultado	Referencia
RAPD/ SSR	*Actinida deliciosa* (kiwi)	Comparar las técnicas moleculares para detectar variación genética	Se detectó VS en plantas micropropagadas y se recomendó combinar técnicas moleculares para una comprobación más fidedigna	(Palombi y Damiano, 2002)
RAPD	*Chrysanthemum morifolium*	Caracterizar y determinar la VS en cultivares comerciales	Se detectó VS después de un mes de cultivo	(Martín *et al*., 2002)
RAPD	*Musa* spp. (banano, Cavendish)	Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la VS	IBA y AIA, en combinación con BA, indujeron mayor tasa de multiplicación y mayor VS	(Bairu *et al*., 2006)
RAPD/ SSR	*Musa* spp.	Caracterizar y determinar la VS *in vitro*	Se encontró homogeneidad entre los resultados de RAPD y SSR. No se detectó VS	(Venkatachalam *et al*., 2007)
RAPD	*Phalaenopsis* sp. ("True Lady")	Detectar VS en las plantas micropropagadas *in vitro*	Se detectó 1.5% de VS, evidente por alteraciones en la morfología floral	(Chen *et al*., 1998)
RAPD	*Oryza sativa* (arroz)	Detectar VS en plantas providentes de callos.	Se detectó la aparición de mutaciones recesivas y variaciones en el ADN genómico. Los niveles de variación de ADN predominaron en secuencias altamente repetidas y en algunos casos sin efecto en el fenotipo	(Godwin *et al*., 1997)
RAPD	*Prunus persica* (melocotón)	Determinar la VS de plantas regeneradas de callos embriogénicos	Se encontró que la frecuencia de VS fue dependiente del genotipo	(Hashmi *et al*., 1997)
SSR	*Quercus suber* (roble, alcornoque)	Determinar la estabilidad genética de callos embriogénicos provenientes de plantas adultas y jóvenes.	Se observaron los mismos patrones en todas las muestras analizadas, excepto en un genotipo que presentó 2.5% de mutación.	(Lopes *et al*.,2006)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Localización del área de estudio

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal, ubicado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Universitario “El Cerrillo”, Toluca, Edo. México.

V.2 Material biológico experimental

Se emplearon ejes embrionarios cigóticos maduros de 720 semillas y la zona meristemática de 240 plántulas de seis meses cultivadas bajo condiciones de invernadero de dos especies de *Agave*, el material biológico fue colectado como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Lugar de colecta de la semilla de las especies de *Agave*.

Especie	Lugar de colecta	Coordenadas	Año de colecta
Agave salmiana	Cerrillo Piedras Blancas	Latitud 19°24'32.12"N Longitud 99°41'26.80"O	2016
Agave marmorata	Oaxaca, Valles Centrales	Latitud 16°52'8.18"N Longitud 96°46'34.00"O	2018

El establecimiento de cada fase experimental se desarrolló como se muestra en la Figura 7.

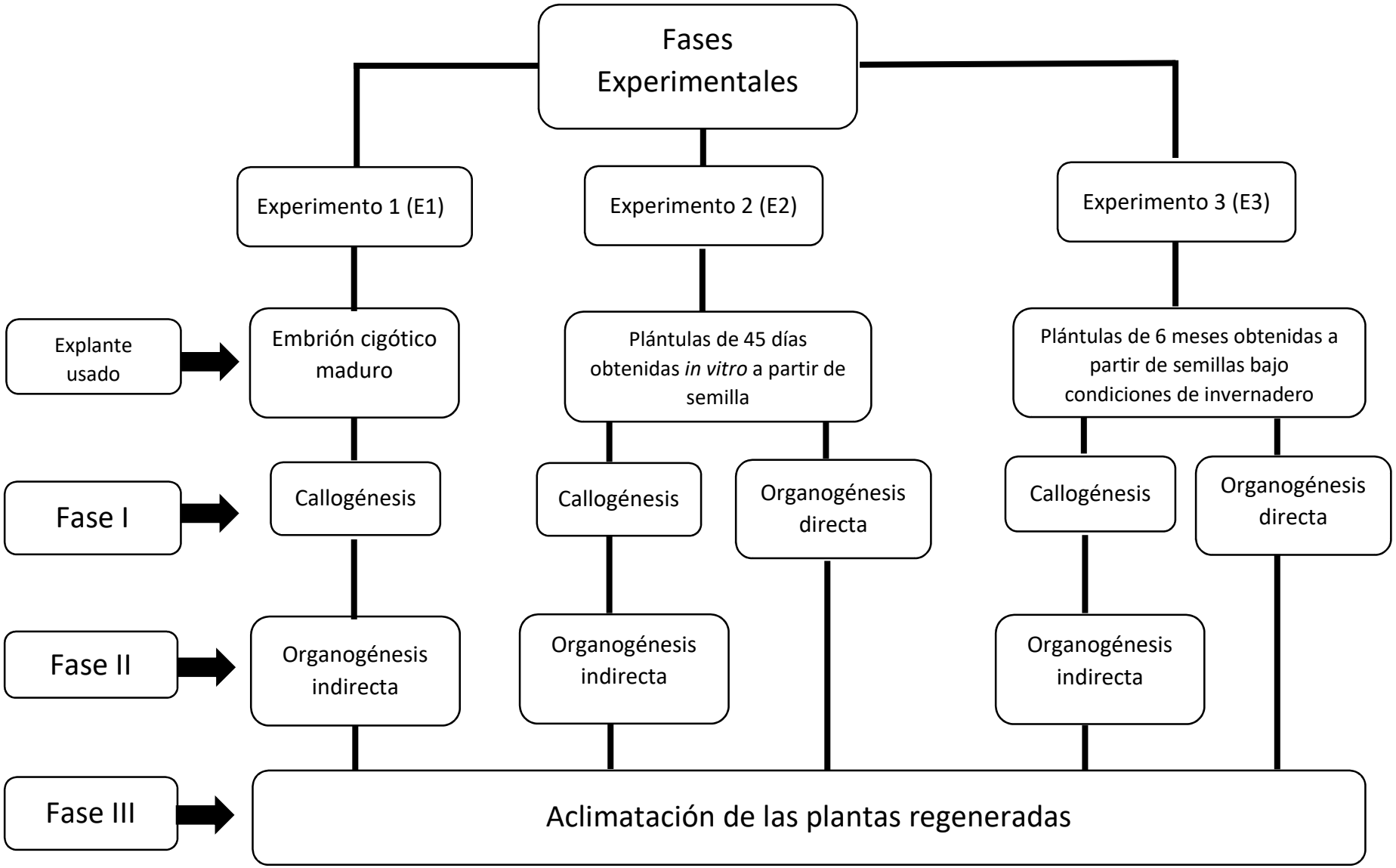

Figura 7. Esquema de las fases experimentales.

V.2.1 Explantes utilizados en el Experimento 1

Para este experimento se emplearon 240 embriones cigóticos extraídos de las semillas de ambas especies de *Agave*. Cada embrión constituyó una unidad experimental. Se realizaron 30 repeticiones por los cuatro tratamientos empleados para inducir OI.

V.2.2 Explantes utilizados en el Experimento 2

Semillas de ambas especies fueron germinadas en recipientes de plástico de 8.5 x 7.5 cm de diámetro con un volumen de 500 ml en donde se colocó el medio de cultivo formulado en base a las sales inorgánicas MS (Murishige y Skoog, 1962) más 5 gramos de Agar (Sigma®), las especificaciones del medio se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Medio de cultivo utilizado para germinar semillas y el crecimiento de los brotes regenerados de ambas especies de *Agave*.

MS (%)	Sacarosa (g/L)	Carbón activado (g)
25	60	0.5

El medio de cultivo fue esterilizado en una autoclave vertical (AESA®) a 121°C a 1.1 $kgcm^{-2}$ de presión durante 20 minutos (min). El pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 con NaOH y HCl 1.0 N ó 0.1 N.

A los 45 días después de iniciado el cultivo (ddic) a partir de las plántulas generadas (Tabla 5) se usaron los explantes para el experimento. Se eliminaron sus hojas y raíces, y la porción restante, que contenía la región meristemática (Figura 8), se colocó en los tratamientos correspondientes. Se emplearon 30 explantes de cada especie por cada tratamiento utilizado para inducir OI y OD. Cada explante constituyó una unidad experimental.

Tabla 5. Características de las plantas cultivadas *in vitro* utilizadas en el E2.

	A. salmiana	*A. marmorata*
Altura de planta (cm)	4.9	3.3
Número de hojas	3	2.4
Número de raíces	2.4	3
Longitud de raíz principal (cm)	3.3	5.6
Diámetro de tallo (cm)	0.47	0.35

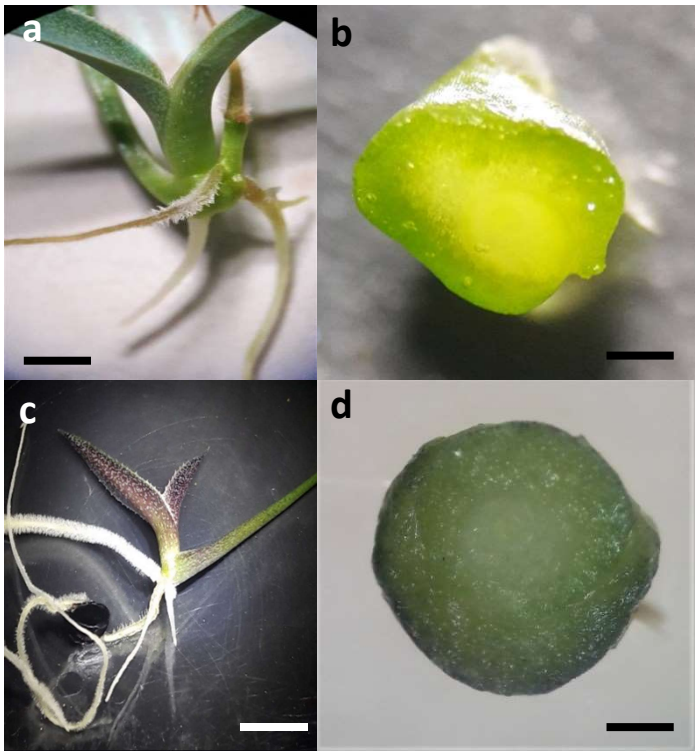

Figura 8. Plántula de As (a) y Am (c) germinada *in vitro* a los 45 ddic. Barra = 1cm (a), explante final conteniendo la zona meristemática utilizada para el E2 (b y d), barra = 1mm.

V.2.3 Explantes del Experimento 3

Para el E3 los explantes utilizados fueron de plántulas de 6 meses de edad obtenidas por germinación y cultivadas bajo condiciones de invernadero cuyas características se muestran en la Tabla 6. Estas fueron tratadas previamente con una combinación de agroquímicos, se les realizaron tres cortes; el primero consistió en eliminar hojas y raíces de la plántula, la parte basal se llevó al laboratorio donde continúo el segundo corte eliminando los extremos o parte circundante del explante y tejido foliar que aún prevalecía. En condiciones de asepsia se realizó el último corte profundo llegando a la región meristemática que es la zona de interés para esta investigación (Figura 9). Posteriormente los explantes fueron establecidos en los tratamientos correspondientes. Se emplearon 15 explantes de cada especie por cada tratamiento utilizado para inducir OI y OD. Cada explante constituyó una unidad experimental.

Tabla 6. Características de las plantas cultivadas *ex vitro* utilizadas en el E3.

	A. salmiana	*A. marmorata*
Altura de planta (cm)	7.7	3.4
Número de hojas	5	3
Número de raíces	5.7	6.3
Longitud de raíz principal (cm)	5.8	6.5
Diámetro de tallo (cm)	0.96	0.65

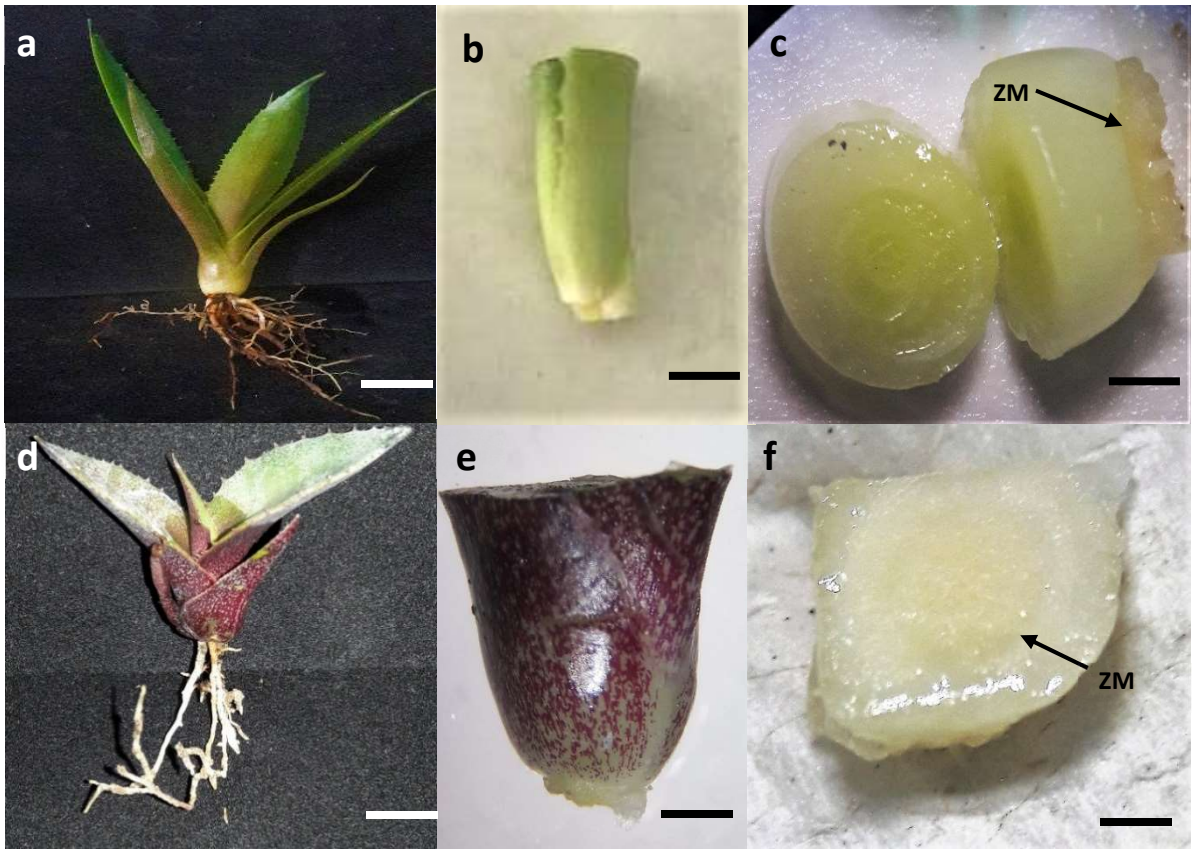

Figura 9. Plántula de *A. salmiana* y *A. marmorata* de 6 meses cultivada *ex vitro* y utilizadas en el E3 (a y d). Explante basal de As (b) y Am (e) después de los primeros cortes. Barra = 1cm, explante final mostrando la zona meristemática (ZM) del plato basal (c) y de la región central (f). Barra = 1 mm.

V.3 Desinfección del material

V.3.1 Desinfección de semillas

Las semillas fueron colocadas en un saco de malla tul (100 semillas por saco) para ser sumergidas en una solución jabonosa (Axión ®) con unas gotas de TWEEN 20®, se enjuagaron a chorro de agua por 10 min, posteriormente fueron trasladadas a una campana de flujo laminar (CFL) para trabajar en condiciones de asepsia, dentro

de la CFL se realizó un enjuague con etanol al 70% durante un min, a continuación se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (100 ml de Cloralex ® más 400 ml de agua) durante 15 min en constante agitación, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se dejaron reposar durante 24 horas (h) en gentamicina (Sulfato de gentamicina) a una proporción 16 µl L^{-1}, finalmente dentro de la CFL se extrajo el EC de la semilla y se colocó por 10 min en agua destilada estéril con Silver Plant (50mg AgNP's L^{-1}), (IMPI: Expediente: 1494446 Folio: 0109830). Inmediatamente los EC fueron sembrados en el medio.

V.3.2 Desinfestación de explantes *ex vitro* para el E3

El procedimiento para la desinfección de los explantes para el E3 fue similar al usado para las semillas con algunas modificaciones; la mayoría de las pencas y todas las raíces fueron desprendidas de las plántulas como se muestra en la Figura 10 donde las líneas negras representan el lugar donde se realizaron los cortes, y luego sumergidas en una solución compuesta por 1g L^{-1} del bactericida Agry-gent® Plus 800 (Sulfato de gentamicina más clorhidrato de oxitetraciclina) más 1g L^{-1} del fungicida sistémico Cercobin®M (Tiofanato metílico) por 10 min.

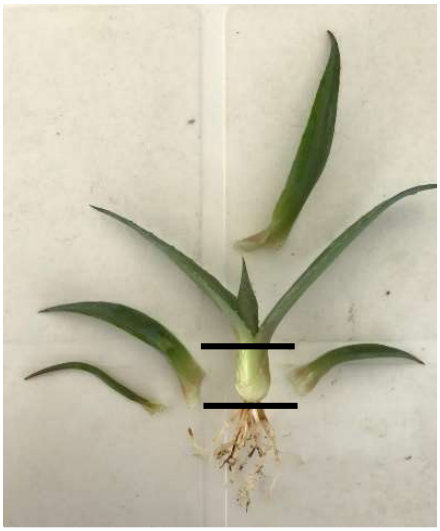

Figura 10. Plántula de 6 meses de *A. salmiana*.

La parte basal de las plántulas se sumergió en una solución jabonosa con unas gotas de TWEEN 20® y luego enjuagadas a chorro de

agua por 15 min, en condiciones de asepsia se realizó el segundo corte, el explante fue tratado con alcohol al 70% por un min, posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 20 min en constante agitación, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se dejaron reposar durante 25 min en gentamicina, el tercer corte fue realizado en esta fase y el explante final (Figura 9c y f) fue sumergido durante 30 min en una solución con Silver Plant (50 mg L^{-1} de AgNP's) para ser establecidos en los medios de cultivo correspondientes.

V.4 Inducción de callogénesis

Independientemente del experimento E1, E2 y E3, los explantes usados para callogénesis se establecieron en cuatro medios formulados con sales inorgánicas MS ya que han sido ampliamente reportadas en la micropropagación de diversas especies de agave a partir de distintos explantes (Binh *et al*., 1990; Das. 1992; Nikam *et al*., 2003; Powers y Backhaus, 1989; Robert, Herrera, Contreras, y Scorer, 1987; Santacruz-Ruvalcaba *et al.*,1999), en diferentes proporciones, más 6 gramos de Agar (Sigma®). Estos fueron vaciados en cajas Petri de plástico, colocando en cada caja 10 EC para el E1, 10 explantes de la ZM *in vitro* para el E2 y cinco explantes de la ZM de las plántulas *ex vitro* para el E3, dando un total de 30 repeticiones para el E1 y E2 y 15 repeticiones para el E3 por tratamiento, todos los tratamientos fueron incubados en completa oscuridad a una temperatura de 25±2°C. Se realizaron observaciones a los 30, 60 y 90 ddic para evaluar la respuesta de los explantes a cada tratamiento en relación a la formación de callo embriogénico y diariamente para detectar presencia de contaminación, 90 ddic

aquellos explantes en donde se observó la formación de callo, fueron transferidos a un medio fresco para la inducción de brotes. En el caso particular del T1 (0.1 y 0.1 de BA y 2,4-D), no se le agregó agua de coco reportada por Binh *et al*. (1990) en su protocolo de inducción de callo (Tabla 7).

Cabe mencionar que para el E1 se remplazaron los EC que no germinaron hasta llegar a las 30 repeticiones requeridas. La visualización de cambios morfológicos en los explantes se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Tabla 7. Tratamientos evaluados para inducir callogénesis en dos especies de *Agave*, en el experimento E1, E2 y E3.

T	Medio	Reguladores de crecimiento		Sacarosa (g/L)	Vitaminas	Referencias
	MS (%)	2,4-D (mg L^{-1})	BA (mg L^{-1})			
1*	100	0.1	0.1	20	MS	(Binh *et al*., 1990)
2	100	1.0	15.0	30	MS	NA
3	25	3.0	1.0	60	Vit L2	(Nava-Becerril y Arzate-Fernández, 2015)
4	25	5.0	3.0	60	Vit L2	(Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011)

*modificado

V.5 Organogénesis directa e indirecta

Se evaluó el efecto de cinco concentraciones de BA descritas en la Tabla 8 para la regeneración de brotes, se utilizaron frascos tipo gerber colocando tres callos para el E1 y cinco explantes de la ZM de plántulas *in vitro* (E2) y *ex vitro* (E3) por frasco,

manteniendo los cultivos en condiciones de luz (16/8h), incubados a una temperatura de 25±2°C.

Tabla 8. Concentraciones de citocinina evaluadas en la organogénesis en ambas especies de *Agave*.

Tratamiento	BA (mg L^{-1})	Sacarosa (g L^{-1})	MS (%)
T1	0.0		
T2	3.0		
T3	4.0	40	100
T4	5.0		
T5	10.0		

El número de brotes se contabilizó a los 60 ddic realizándose un subcultivo a los 30 ddic. Los brotes obtenidos se separaron del explante original y se transfirieron al medio de crecimiento (Tabla 4), para promover la formación del sistema radical.

V.6 Aclimatación de plántulas a condiciones *ex vitro*

A los 45 ddic en el medio de crecimiento, los brotes se sacaron del medio de cultivo, se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de agar (Tabla 4).

Se seleccionaron las 20 plántulas con mayor vigor de cada tratamiento, obteniendo un total de 60 plantas por especie, para ser colocadas en charolas de 180 cavidades con plugs de espuma fenólica (peatFOAM®). Las charolas fueron sumergidas en dos soluciones, la primera al 25% del fertilizante soluble Hydro-Solution (GrowCare®) y la segunda el fertilizante soluble antes mencionado más el

enraizador Phyto Raizon® Plus (1 g L^{-1}). Protegidas por una cubierta plástica. Las condiciones que predominaron dentro del microtúnel fueron; 50% de humedad y entre 20-35 °C de temperatura. Se realizaron observaciones periódicas con la finalidad de detectar posibles cambios morfológicos.

La supervivencia en invernadero de las plantas generadas *in vitro* se determinó a los 30 días después de iniciada la aclimatación (ddia).

V.7 Estudio de la variabilidad genética

V.7.1 Procedimientos generales

El trabajo se dividió en dos etapas, la primera como se explica en la Figura 11, 45 ddic en el medio de crecimiento se seleccionaron aquellos explantes *in vitro* de tamaño uniforme a partir de los cuales se tomó el tejido foliar, se realizó la extracción de ADN y la obtención de perfiles génicos de seis clones de un mismo individuo para el E1 y de tres clones de un mismo individuo en el E2 y E3 de OD y tres de OI, dando un total de seis clones de cada experimento los cuales se corrieron en un mismo gel, cabe señalar que se seleccionaron los individuos de los mejores tratamientos en cada experimento obtenidos en la Etapa 1 (Figura 11).

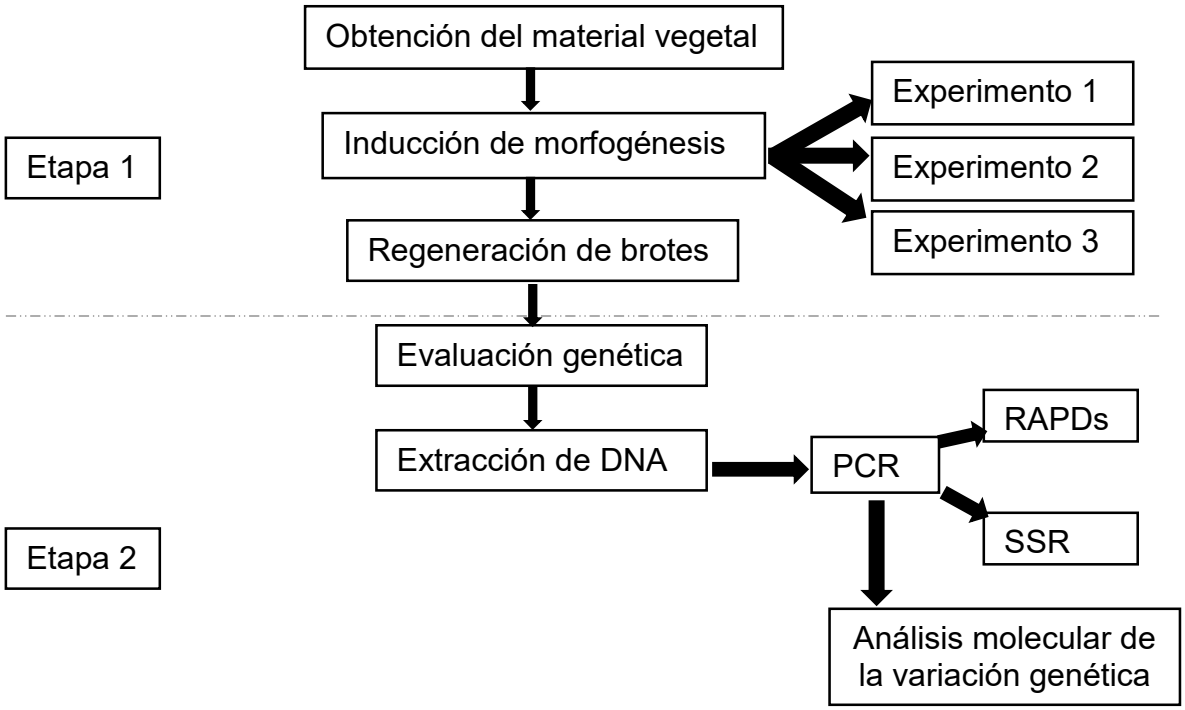

Figura 11. Establecimiento de las condiciones para la inducción de morfogénesis y posterior evaluación genética de los clones en ambas especies de *Agave*.

La extracción de ADN genómico se realizó usando el método CTAB (bromuro hexadeciltrimetilamonio) con ligeras modificaciones al método de Zhou *et al.* (1999). Las modificaciones consistieron en macerar 150 mg de tejido vegetal fresco en un mortero de porcelana, previamente congelado (-20°C), lavándose en tres ocasiones con Wash Solution (WS). El pellet se incubó con el compuesto activo de bromuro hexadeciltrilamonio (CTAB) y nuevamente se lavó en dos ocasiones con cloroformo: alcohol isoamímilo, el ARN se eliminó con 1µL de RNAsa y posteriormente se hizo un lavado con etanol al 96% para lograr su precipitación. Finalmente, el ADN se diluyó en una solución buffer tris- EDTA (TE) hasta 70 µl y se conservó a -20°C en un congelador marca General Electric^{MR} hasta su uso.

V.7.2 Análisis del ADN extraído

Para cuantificar la concentración de ADN se utilizó un biofotómetro marca Eppendorf ®; donde se mezclaron 4 μL de ADN en 196 μL de agua desionizada esterilizada (MilliQ) y se colocó la muestra en las celdas de lectura para biofotómetros. Se registró la concentración (ng/μL), la absorbancia a 260 y 280 y la relación 260/280 nm para cada una de las muestras.

Se realizó un análisis electroforético para comprobar la integridad del ADN extraído, para este proceso se corrieron las muestras de cada individuo de dos especies de *Agave,* 3 μL del ADN total extraído mezclados con 3 μL de azul de bromofenol (BPB), como marcador de carga, en un gel de agarosa tipo II (Sigma-Aldrich®) al 0.8% en un sistema de electroforesis horizontal marca Easycast™ modelo B2 conectado a una fuente de poder marca Apelex™, modelo PS 304 *Minipac III* serie 85963, durante una hora y veinte minutos a 70V y 120mA. Los resultados del corrimiento electroforético fueron visualizados en un Transiluminador marca UVP™ modelo MP20 [P/N 95-0398-01].

V.7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador marca Labnet International Inc. Modelo MultiGene optiMAX (Figura 12d), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para este proceso, el ADN se diluyó en una solución buffer de TE (10mM de Tris-HCl con 1mM EDTA pH 7.0) con el fin de obtener un volumen final

de 20µL y una concentración final de 10ng μL^{-1}; de igual forma, los iniciadores a una concentración de 200µM (InvitrogenTM) fueron diluidos en una solución buffer de TE (10mM de Tris-HCl con 1 mM EDTA pH 7.0) para obtener un volumen final de 50µL y una concentración final de 20µM. Una vez diluidos el ADN y los iniciadores, éstos se almacenaron a 20°C en un refrigerador marca General ElectricMR hasta su uso (Figura 12c).

Para la amplificación de ADN la reacción se preparó en tubos eppendorf de 200 µl previamente etiquetados. La concentración final de la reacción se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Reactivos y volumen utilizado para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Componente	Cantidad (µL)
Agua MilliQ	6.8
5X My Taq Reaction Buffer (Bioline™)	1.0
50 $MgCl_2$	0.3
10 mM dNTPs	0.2
My TaqADN polimerasa (Bioline™)	0.2
Iniciador (20 µM)	0.5
ADN (10 ng μL^{-1})	1.0
Total	10.0

V.7.4 Selección de cebadores

Se emplearon cuatro iniciadores de dos tipos: dos iniciadores RAPD y dos iniciadores ASSR; dichos iniciadores se describen en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación del ADN nuclear de *A. salmiana* y *A. marmorata.*

Nombre del iniciador	Tipo	Secuencia (5'→ 3')	Número de bases	%GC
***Y24**	RAPD	AACCGCGCTC	10	**70**
***Y41**		GCGTCCTGGG	10	**80**
****NCADN-3'ASSR20**	ASSR	(CT)7 GCA	17	**53**
****NCADN-3'ASSR29**		(CT)7 GTA	17	**47**

Fuente: *Yamagishi (1995), **Yamagishi *et al*.(2002)

A continuación, se presentan las condiciones de amplificación para cada uno de los iniciadores RAPD y ASSR; se describen la Temperatura de Desnaturalización (DT), la Temperatura de Alineación (AT) y la Temperatura de Elongación o Extensión (ET) para cada ciclo de reacción. Los ciclos térmicos finalizaron para todos los iniciadores a una temperatura de 4ºC para terminar la reacción.

- Programa de amplificación para los Iniciadores; 3'-ASSR20, 3'-ASSR29:

(DT) 94°C x 9 min } 1 ciclo
Ciclo inicial

(DT) 94°C x 1 min
(AT) 46 °C x 1 min
(ET) 72°C x 1 min } 45 Ciclos

(ET) 72° C x 10 min } 1 Ciclo
Ciclo final

- Programa de amplificación para los Iniciadores RAPD Y24, Y41:

(DT) 94°C x 5min
(AT) 54° C x 1 min
(ET) 72° C x 2 min } 1 ciclo
Ciclo inicial

(DT) 94°C x 1 min
(AT) 54 °C x 1 min
(ET) 72°C x 2 min } 41 Ciclos

(DT) 72° C x 10 min
(AT) 54°C x 1 min
(ET) 72°Cx 5 min } 1 Ciclo
Ciclo final

V.7.4.1 Separación de los fragmentos amplificados

La separación de los fragmentos de ADN se realizó en cámaras de electroforesis horizontal marca EasycastTM modelo B2 que contenían 750 mL de solución buffer de 1X TAE (Tris-acetato-EDTA) (Figura 12f.), usando un gel de agarosa tipo II (Sigma-Aldrich®) al 1 %, al cual se le adicionaron 3 µL de bromuro de etidio. Las muestras se cargaron en los pozos del gel con un volumen final de 6 µL, que contenían 3 µL del producto de PCR y 3 µL del marcador de carga azul de bromofenol (BPB) para observar el corrimiento de los fragmentos de ADN. Las muestras fueron flanqueadas con dos marcadores escalera: de 100-15,000 pb (derecha) y 50-2500 pb (izquierda) (Invitrogen ™) para medir el tamaño de los fragmentos amplificados, posteriormente el sistema horizontal de electroforesis fue conectado a una fuente de poder marca ApelexTM, modelo PS 304 *Minipac III* y las condiciones de corriente eléctrica se realizaron a 80V y 120mA durante 80 min (Figura 12e).

Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un Transluminador marca UVP™ modelo MP20 (P/N 95-0398-01). Usando el mismo equipo se tomaron fotos para su posterior análisis (Figura 12g).

Figura 12. Proceso de amplificación de ADN: a) Muestra de tejido de As, b) Obtención de pellet de ADN, c) Tubos Eppendorf con las mezclas para la PCR, d)amplificación del ADN en el termociclador, e) y f) corrimiento electroforético, g) exposición del gel de agarosa a la luz UV en el transiluminador.

V.8 Variables evaluadas

Porciento de formación de callo

Se aplicó la siguiente ecuación:

- Experimento1 y 2:

$$\%\ formación\ de\ callo = \frac{(Número\ de\ callos\ observados)100}{30}$$

- Experimento 3

$$\%\ formación\ de\ callo = \frac{(Número\ de\ callos\ observados)100}{15}$$

Número de brotes por explante

El número de brotes se contabilizó a los 45 ddic en cada unidad experimental, después de ser sembrado en el medio sin reguladores de crecimiento vegetal.

Longitud de brotes

Se midió de la base a la punta de la hoja más grande con un calibrador vernier digital marca Steren®, la primer medición se realizó antes de pasar los explantes al medio de crecimiento y 45 ddic antes de comenzar con la aclimatación *ex vitro* de las plantas regeneradas.

Porciento de plantas aclimatadas.

Se aplicó la siguiente ecuación:

$$\%\ aclimatación = \frac{(Número\ plantas\ sobrevivientes\ a\ los\ 30\ ddia)100}{Número\ total\ de\ plantas}$$

Evaluación de contaminación

La detección de los tratamientos contaminados se inició a los cuatro días después de iniciado el cultivo *in vitro*, para determinar la presencia de hongos o bacterias,

que se pudieran desarrollar en el medio de cultivo e impidieran el buen desarrollo del presente trabajo, posteriormente se determinó el porcentaje de contaminación aplicando la siguiente formula:

$$\%\ contaminación = \frac{(Número\ frascos\ contaminados)100}{Número\ total\ de\ frascos}$$

Evaluación de la variación somaclonal

- Porcentaje de polimorfismo: se realizó mediante una Matriz Binaria de Datos (MBD) donde se señala la presencia (1) o ausencia (0) de bandas complementarias claras.
- Distancia genética: se estimó a través de los valores de distancia genética según (Nei, 1972).

Aclimatación

30 ddia las variables evaluadas fueron:

- Altura de la planta
- Número y longitud de raíz
- Porcentaje de supervivencia

V.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre el porcentaje de obtención de callo a los 90 ddic, número y longitud de brotes regenerados se sometieron a un análisis de varianza con ayuda del software Stathgraphics versión 5.0, y donde se presentaron diferencias

significativas entre los tratamientos evaluados se realizó una prueba de comparación de medias con la diferencia mínima significativa (LSD), con un nivel de significancia del 95%.

Para el análisis molecular se tomaron seis clones generados de un mismo individuo para el E1 y tres clones de un mismo individuo para el E2 y E3, los individuos seleccionados fueron tomados de los mejores tratamientos de OD y OI.

La MBD se utilizó para realizar el análisis de la VS de las dos especies de *Agave* evaluadas. Cabe señalar que se compararon visualmente los patrones de bandeo amplificados en cada uno de los primers para identificar discrepancias que pudieran evidenciar variación somaclonal entre los clones elegidos para el estudio, así como para identificar bandas monomórficas y polimórficas.

La diferenciación genética se estimó a través de los valores de distancia genética según Nei (1972); con el fin de visualizar de forma más apropiada las similitudes entre los individuo, se elaboró un dendrograma, utilizando una matriz de similitud, mediante el método de agrupamiento no ponderado de pares utilizando el promedio aritmético conocido como UPGMA (del inglés unweighted pair-group meted with aritmetic averaging) con el programa POPGENE (versión 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta and Center for International Forestry Research, AB, Edmonton, Canadá), (Yeh y Boyle, 1999).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Evaluación de la contaminación

Por los resultados obtenidos, solo se evaluó el porcentaje de contaminación en el caso particular de semillas de As, ya que fue la única especie que presentó problemas de este tipo, se realizaron varias pruebas de desinfección a la semilla llegando a la conclusión de que el problema de contaminación radica en el endospermo por lo que se realizaron varios ensayos modificando su desinfección.

La contaminación se redujo a un 100% cuando se extrajo el embrión cigótico de la semilla y se dejaba reposando en nanopartículas de plata (AgNP's) por 10 min, comprobando su potencial antimicrobial estudiado por Wu *et al*. (2008).

En los explantes empleados en el E3, se evaluó el porcentaje de contaminación provocado por hongo/bacteria no registrándose contaminación los primeros siete días en ninguno de los tratamientos, sin embargo, al 8° ddic se observó un nivel de contaminación del 30% en *A. salmiana* y 10% en *A. marmorata*. Lo anterior puede explicarse dado el origen del explante, al ser plantas extraídas de suelo y bajo condiciones no controladas la presencia de microorganismos es latente, se corroboró mediante un análisis fitosanitario en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento ubicado en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México,

el estudio arrojo la presencia de múltiples organismos como: *Fusarium* sp*., Erwinia* sp*, y Rhizoctonia* sp., corroborando lo demostrado por Abreu *et al*. (2016) donde el empleo de métodos de desinfección superficial del material procedente de plantaciones no garantiza la eliminación de microorganismos.

El uso de antibióticos como Gentamicina y AgNP's resultó efectivo, disminuyó el porcentaje de contaminación sin causar efectos fitotóxicos visibles contradiciendo lo reportado por Gil-Vega *et al*. (2006), donde la contaminación microbiana en *Agave tequilana* no pudo ser controlada por antibióticos.

Resulta importante el estudio de otros agentes antimicrobianos para erradicar el problema de contaminación en estas especies, como el empleo de extractos vegetales reportado por Obledo-Vázquez *et al*. (2004) donde usó un extracto comercial de toronja (*Citrus grandis* Osbeck) con conocida actividad antimicrobiana resultando factible para el control de los microorganismos contaminantes.

Cabe mencionar que la contaminación se presentó en forma aleatoria y los tratamientos contaminados fueron repuestos.

VI.2 Experimento 1

VI.2.1 Inducción de callogénesis en el E1

En el E1 se observó la formación de callo en todos los tratamientos a excepción del T1 (0.1 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.1 mg L^{-1} BA) donde sólo se presentó una elongación del hipocólito sin formación de callo, esto lo atribuimos a el explante utilizado, ya que, Binh *et al*.(1990) empleó segmentos nodales de *A. sisalana*, *A. fourcoroydes* y *A. cantala*, los cuales si tuvieron respuesta con las mismas concentraciones de RCV.

La desdiferenciación de los ejes embrionarios cigóticos se observó 5 días después de iniciado el cultivo (ddic) en el caso de Am, en As el proceso de desdiferenciación fue a los 15 ddic. En ambas especies el proceso morfogénico inició con el aumento de tamaño de la zona radical en forma de bellota resultado similar al reportado por Arzate-Fernández *et al*. (2011) con 3.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 1.0 mg L^{-1} de BA en *A. angustifolia*.

Sin embargo la formación de masas callosas comenzó a presentarse desde los 8-10 ddic en el caso de Am y entre los 20-25 ddic en As. El porcentaje de formación de callo fue homogéneo en ambas especies al obtener 100% en todos los tratamientos empleados (exceptuando el T1). La mayoría de los callos obtenidos en ambas especies fueron callos compactos, ligeramente amarillentos en Am, sin embargo en el T2 para As y T4 para Am en donde se encontró el mayor porcentaje

(100%) y peso de callo (0.2464g para As y 0.8168g para Am) se formaron callos friables en ambas especies (Figura 14a y b).

El mayor peso de callo en As fue de 0.2464 g en promedio, obtenido con la combinación de 1.0 mg L^{-1} de 2,4-D más 15 mg L^{-1} de BA (T2), mientras que para Am fue el tratamiento que contenía 5 mg L^{-1} de 2,4-D y 3 mg L^{-1} de BA (T4) obteniendo 0.8168 g promedio (Tabla 19). Los pesos de ambas especies quedan en la media de lo reportado en *Agave angustifolia* (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011). Se sabe que a la adición de 2,4-D al tejido inactivo le sigue un aumento espectacular de ARN, bajo condiciones de inducción de callo, solo las células que se dividen sintetizan y acumulan ARN (Yeoman y Aitchison, 1973) por lo tanto es posible que las altas concentraciones de esta auxina conduzcan a la división celular y consecuentemente a la formación de callos (Groenewald, 1975), lo anterior concuerda con lo observado en este trabajo donde se obtuvieron mejores resultados a concentraciones altas de 2,4-D lográndose la formación de callo.

Cabe mencionar que después de transferidos los callos al medio de brotación estos siguieron creciendo en volumen.

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos respecto al peso de callo a los 90 ddic, el análisis de varianza mostro que el valor de “P” es menor a 0.05 en ambas especies a un nivel de confianza del 95% lo que significa que existe una diferencia

significativa entre los tratamientos probados respecto al peso de callo como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de varianza para evaluar el peso de callo a los 90 ddic en el E1 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	0.9753	3	0.3251	57.39	0.0000	10.6205	3	3.5402	108.21	0.0000
Dentro de grupos	0.6570	116	0.0057			3.79501	116	0.0327		
Total	1.6323	119				14.4155	119			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

VI.2.1.1 Inducción de organogénesis indirecta en el E1

Se logró apreciar el agrupamiento de brotes diferenciados de coloración verde, creciendo contiguamente a partir de las dos semanas de transferencia en As y después de 10 días en Am, mismos que fueron separados de manera individual para su conteo y posterior transferencia al medio de crecimiento.

La regeneración de brotes a partir de los callos obtenidos se presentó en todos los tratamientos que contenían BA pero en el que se observó una mejor respuesta fue en el T5 (10 mg L^{-1} de BA) para As en donde se obtuvieron 20.6 brotes/explante (Fig. 15a), y el T4 en Am (5 mg L^{-1} de BA) con un total de 24.7 brotes/explante (Figura 15b). A pesar del excelente resultado obtenido en Am con el T5 (10 mg L^{-1} de BA), este presentó vitrificación por lo que las plantas resultaron inviables, al reducir la cantidad de BA a 5 mg L^{-1} se obtuvo un resultado muy similar en número

de brotes, mejorando significativamente el crecimiento y desarrollo de estos al no presentar problemas de vitrificación (Tabla 23). Los resultados corroboran lo planteado por Caraballo *et al*. (2010) en *Agave fourcroydes* donde obtuvo brotes con vitrificación empleando una combinación de 0.025 2,4-D + 10.00 BA (mg L^{-1}). Se ha reportado que altas concentraciones de citocininas durante la etapa de multiplicación produce brotes hiperhídricos con baja capacidad de crecimiento y desarrollo anormal en algunas especies de *Agave*, ya que, al presentar desorganización celular, ausencia de tejido vascular y tejido de empalizada, conteniendo solo mesófilo esponjoso las plantas con estas características no sobreviven a la transferencia en suelo (Castro-Concha, 1990).

No se observó brotación en aquellos tratamientos carentes de BA por el contrario, conforme aumentó la dosis de BA la inducción de brotación, en la mayoría de los tratamientos, también incremento.

El análisis de varianza de los datos experimentales mostraron los efectos significativos entre los tratamientos en ambas especies, como se puede observar en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de varianza para evaluar la inducción de brotes por OI a los 90 ddic en el E1 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Factor de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	4802.4	14	343.029	76.00	0.0000	7970.49	14	569.321	49.20	0.0000
Dentro de grupos	338.5	75	4.51333			867.833	75	11.5711		
Total	5140.9	89				8838.32	89			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

VI.2.2 Experimento 2

La germinación de las semillas ocurrió en la segunda semana iniciado el cultivo obteniéndose un 70% de germinación en As. Un periodo similar al reportado por Puente-Garza *et al*. (2015), obtuvieron un 93% de germinación 11 ddic en la misma especie. Se obtuvo un 55% de germinación en Am el cual fue registrado después de 13 ddic. Entre los 45-50 días las plantas germinadas ya tenían de dos a más hojas, y alcanzaban una altura de 2-3 cm en ambas especies (Figura 13), fue entonces cuando se tomó la ZM de las plántulas generadas, transfiriéndola a los medios correspondientes para promover la organogénesis directa e indirecta en este experimento.

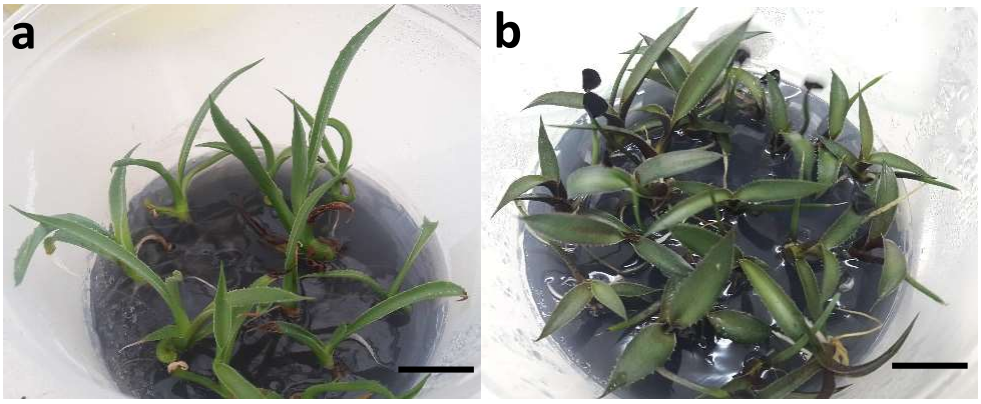

Figura 13 Plántulas obtenidas de semilla a los 45 ddic de *A. salmiana* (a) y *A. marmorata* (b).Barra= 1 cm.

VI.2.2.1 Inducción de callogénesis en el E2

La formación de masa callosa comenzó a los 10 ddic en Am y a los 15 ddic en As. Existió una analogía entre el porcentaje de callogénesis encontrado y el peso de callo. El comportamiento de los tratamientos fue contrastante en ambas especies (Tabla 19); es decir, bajas concentraciones de ambos reguladores de crecimiento T1 (0.1 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.1 mg L^{-1} de BA) favorecieron la inducción de callogénesis en As donde se obtuvieron callos mucilaginosos, sin embargo con la adición de una mayor concentración de la citocinina BA (15 mg L^{-1}) se obtuvo el mayor peso (0.3267 g en promedio), formación de callo (70%), y callos tipo friables (Figura 14c y d), indicando que la presencia de este RCV favorece la desdiferenciación de las células de la ZM de esta especie.

Contrario a lo obtenido en As, las concentraciones altas de 2,4-D favorecieron la formación de callo en Am, siendo la concentración de 5 mg L^{-1} de 2,4-D y 3 mgL^{-1} de BA (T4) el mejor tratamiento para la formación y peso de callo al desarrollar 100%

de callogénesis y 0.7173 g en promedio, además de obtener callos friables los cuales se disgregaban con facilidad al igual que lo observado por Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011) en callos de *Agave angustifolia* en concentraciones similares.

Cabe mencionar que a partir de los 45 ddic algunos explantes de ambas especies mostraron una oxidación parcial del tejido calloso.

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos respecto al peso de callo, a los 90 ddic, el análisis de varianza mostró que el valor de "P" es menor que la "F", esto comprueba que hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en ambas especies como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Análisis de varianza para evaluar el peso de callo a los 90 ddic del E2 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	0.8445	3	0.2815	16.18	0.0000	6.7871	3	2.2624	239.19	0.0000
Dentro de grupos	2.0185	116	0.0174			1.0972	116	0.0095		
Total	2.8629	119				7.8843	119			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

VI.2.2.2 Inducción de organogénesis indirecta en el E2

La formación de brotes inició 20 días posteriores a la transferencia en ambas especies de *Agave*. Se logró la inducción de organogénesis indirecta en todos los tratamientos que contenían BA, así se observó que el mayor número de brotes fue

de 18.4 brotes por explante (Figura 15c), en el T5 con 10.0 mg L^{-1} de BA en As. En Am el mejor tratamiento fue el adicionado con 5 mg L^{-1} de BA (T4) obteniendo 11.3 brotes por explante (Figura 15 d), al aumentar la concentración de BA el número de brotes descendió en esta especie.

El número de brotes se vio favorecido con el aumento de BA en As, por el contrario el número de brotes descendió con una cantidad alta de esta citocinina en Am, por lo que se puede mencionar que esta especie genera mejores resultados con concentraciones moderadas de BA. La oxidación que presentaron algunos callos en ambas especies no repercutió de manera negativa en la inducción de brotación, los callos con estas características también indujeron brotes vigorosos.

En cuanto a la eficiencia de los protocolos, Valenzuela-Sánchez *et al*. (2006) reportaron promedios de hasta 19.5 brotes/explante en *A. tequilana*, por su parte (Silos-Espino *et al*., 2007) alcanzó 20.3 brotes en *A. salmiana* lo que comprueba la eficiencia de este protocolo de propagación (Tabla 1).

Por otra parte, 45 ddic las plantas regeneradas fueron fácilmente identificadas y separadas para ser transferidas al medio de crecimiento (Tabla 4), donde después de 50 días alcanzaron de 2-4 cm de longitud.

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos respecto a los tratamientos probados para la inducción de brotes por organogénesis indirecta, el análisis de

varianza mostro que el valor de “P” es menor que la “F”, esto comprueba que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Análisis de varianza para evaluar los tratamientos respecto a la inducción de brotes por OI a los 90 ddic en el E2 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	21727.4	19	1143.55	821.92	0.0000	20461.4	19	1076.91	662.37	0.0000
Dentro de grupos	806.967	580	1.39132			943.0	580	1.62586		
Total	22534.4	599				21404.4	599			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

VI.2.2.3 Inducción de organogénesis directa en el E2

Los resultados obtenidos de organogénesis directa son similares a los reportados por otros autores en especies de *Agave* (Das, 1992; Enríquez-Valle *et al*., 2005; Santacruz-Ruvalcaba *et al*., 1999; Silos-Espino *et al*., 2007) al obtener regeneración de brotes sin la formación de callo a partir de la ZM de plantas cultivadas *in vitro*.

Puente-Garza *et al*. (2015) consiguieron 14.0 brotes/explante en As con una combinación de 10 mg L^{-1} de BA y 0,04 mg L^{-1} de 2,4-D. Lo anterior corrobora la eficiencia de la concentración de BA empleada en este trabajo para la inducción de brotes en esta especie. Sin embargo, en esta investigación se alcanzó un número mayor de brotes (23.8 brotes/explante) sin la adición de 2,4-D, haciendo más

eficiente el protocolo de brotación (Figura 16a). El número de brotes conseguidos en As fue proporcional a la concentración de BA en el medio, por el contrario en Am una concentración de 10 mg L^{-1} de BA redujo la inducción de brotación (Tabla 21), además de observarse la formación de estructura callosa de consistencia compacta y aspecto amarillento en el 30% de los explantes, a partir de estos callos se formaron brotes vigorosos y con buenas características, resultado similar al obtenido por Aguilar y Rodríguez De la O. (2018) con la misma concentración de BA en *A. marmorata.* El T4 (5 mg L^{-1} de BA) fue el mejor en la proliferación de brotes en Am obteniendo 22.3 brotes/explante (Figura 16b).

Mientras para algunas especies las concentraciones bajas de BA son suficientes para generar brotes como es el caso de *Agave parrasana* Berge donde Santacruz *et al*. (1999) obtuvieron 22 brotes/explante con 3.0 mg L^{-1} de BA sin embargo, con la misma concentración de BA se lograron 7.8 y 4.1 brotes/explante en As y Am, respectivamente, las dos especies estudiadas mostraron un mejor comportamiento en los tratamientos que contenían mayor cantidad de BA. Por otro lado, Martínez-Palacios *et al*. (2003) reportaron 2.2 brotes/explante en *A. victoria-reginae* cultivado con 1mg L^{-1} de BA por su parte Silos-Espino *et al.* (2007) obtuvieron 20.3 brotes por explante con 2.0 mg L^{-1} de BA y 0.25 mg L^{-1} de AIA en la misma especie. Estos resultados confirman la respuesta heterogénea que ocurre entre las especies de *Agave* frente a la adición de diversos RCV mencionada por *Domínguez-Rosales et al*. (2008).

El análisis de varianza mostro que el valor de “P” es menor que la “F”, esto comprueba que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos en ambas especies como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Análisis de varianza para evaluar los tratamientos respecto a la inducción de brotes por OD a los 90 ddic en el E2 de *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	9202.44	4	2300.61	610.74	0.0000	10158.8	4	2539.71	649.68	0.0000
Dentro de grupos	546.2	145	3.7669			566.833	145	3.9092		
Total	9748.64	149				10725.7	149			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de

VI.2.3 Experimento 3

VI.2.3.1 Inducción de callogénesis en el E3

Se logró la formación de callo en la mayoría de los tratamientos probados, también se observó la proliferación de una masa celular de tejido desdiferenciado a los 15 ddic en ambas especies, resultado similar al obtenido por Binh *et al*. (1990) en *A. cantala* Roxb., y *A.fourcroydes* Lem; Romero (2005) en *A. sisalana* Perrine y *A. atrovirens.*

Se observó una correlación positiva entre el porcentaje de formación de callo y el peso de los mismos en ambas especies, los mejores tratamientos mostraron una

mayor inducción de callo así como mayor peso, a concentraciones de 5.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 3.0 mg L^{-1} (T4) de BA en As el tejido comenzó a oxidarse a los 60 ddic pasando a un estado de necrosis a los 90 ddic, de igual manera con concentraciones de 0.1mg L^{-1} de 2,4-D y BA 0.1mg L^{-1} en Am, no hubo respuesta de callogénesis en ninguno de los casos.

Utilizando como explante la ZM de 3 meses de plantas cultivadas en invernadero, en todos los tratamientos donde hubo respuesta se obtuvieron callos compactos en As (Figura 14e), mientras que en Am solo a concentraciones de 5.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 3.0 mg L^{-1} de BA se observó la formación de callos friables (Figura 14f) similares a los encontrados en *A, sisalana* con el mismo explante (Hazra, 2002).

El mejor tratamiento para la inducción de callo en As fue el T2 (1.0 mg L^{-1} de 2,4-D más 15.0 mgL^{-1} de BA) obteniendo 93.3% de callogénesis y un peso promedio de 0.7008 g mientras que para Am fue el T4 con 5.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 3.0 mg L^{-1} de BA (T4), lográndose un 80% de callogénesis y un peso de callo de 1.0870 g (Tabla 20).

A diferencia de la proliferación masiva de callos reportada con igual concentración de RCV (0.1 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.1mg L^{-1} de BA) en otras especies de *Agave* (Binh *et al*., 1990), empleando la ZM de tallo en este trabajo se obtuvo el 60% de formación de callo en los explantes de As, mientras que en Am con esta concentración no se lograron resultados.

Cabe mencionar que, como se muestra en la Tabla 20 a los 90 ddic los callos empezaron a presentar una ligera oxidación en la base del explante. Los explantes del T4 en As después de los 30 ddic comenzaron a oxidarse para terminar en una necrosis total del tejido, lo mismo ocurrió en el T1 de Am.

De manera general, se encontró que una disminución en la concentraciones de citocininas (BA) y, como consecuencia un aumento en la concentración de auxinas (2,4-D) da como resultado una mayor respuesta en el crecimiento de los callos en Am. Lo anterior concuerda con lo reportado por Ramírez-Malagón *et al*. (2008); Valenzuela Sánchez (2006).

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos respecto a los tratamientos probados para la inducción de organogénesis indirecta, el análisis de varianza mostro que el valor de “P” es menor que la “F”, esto comprueba que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Análisis de varianza para evaluar peso de callo a los 90 ddic en el E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	0.5242	3	0.1747	19.84	0.0000	9.3675	3	3.1225	372.56	0.0000
Dentro de grupos	0.4932	56	0.0088			0.4695	56	0.0083		
Total	1.0174	59				9.8369	59			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

VI.2.3.2 Inducción de organogénesis indirecta en el E3

La regeneración de brotes comenzó a los 10 días del transplante en Am y a los 15 días en As. Se logró la inducción de organogénesis con todas las concentraciones de BA probadas. Con una concentración de 10.0 mg L^{-1} de BA en As se obtuvieron 13.8 brotes/explante (Figura 15 e), en Am con 5.0 mg L^{-1} resultó ser la mejor concentración obteniendo 12.5 brotes por explante (Figura 15f). Los explantes formaron un brote inicial a partir del cual aparecieron numeroso brotes a lo largo del tiempo del cultivo. Esta forma de crecimiento e inducción de brotes es similar al descrito por Binh *et al.* (1990); Powers y Backhaus (1989).

Los mejores tratamientos en la regeneración de brotes fueron aquellos que contenían altas concentraciones de BA concordando con Peña *et al*. (2012); Robert *et al*. (1987), pero contrastando con Caraballo *et al*. (2010) donde reduciendo la concentración de BA incremento la regeneración de brotes así como su crecimiento en *A. fourcroydes*.

En el presente trabajo la presencia de BA en ambas especies tiene un comportamiento ambiguo, mientras que en As el incremento de esta citocinina favorece la proliferación de brotes, en Am una concentración de 10.0 mg L^{-1} de BA disminuyó el número de brotes regenerados.

El análisis estadístico arrojó que existen diferencias significativas entre los tratamientos probados en ambas especies (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de varianza para evaluar los tratamientos respecto a la regeneración de brotes por OI a los 90 ddic en el E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	4095.41	19	215.548	198.71	0.0000	6711.24	19	353.223	168.55	0.0000
Dentro de grupos	303.733	280	1.08476			586.8	280	2.09571		
Total	4399.15	299				7298.04	299			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL = grados de libertad

VI.2.3.3 Inducción de organogénesis directa en el E3

Se indujo brotación en todos los tratamientos que contenían BA, el mejor tratamiento para la inducción de brotes en As fue el T5 (10 mg L^{-1}) con 8.4 brotes por explante (Figura 16c), aunque el análisis realizado no mostró diferencias significativas entre la adición de 5 y 10 mg L^{-1} de BA (Tabla 19), lo que indica que duplicando la concentración de BA en el medio no tiene una respuesta significativa en el número de brotes/explante. El mismo comportamiento se muestra en Am, el mejor tratamiento para esta especie es el adicionado con 5 mg L^{-1} de BA obteniendo 14.7 brotes/explante (Figura 16d), el aumento de esta citocinina a 10 mg L^{-1} no favoreció la inducción de brotes, por el contrario el número de brotes obtenidos disminuyó.

El análisis estadístico muestra que el valor de “P” es más bajo que el de “F” por lo que se puede aseverar que hay diferencias significativas entre los tratamientos

probados para la regeneración de brotes en ambas especies de *Agave*, como se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis de varianza para evaluar los tratamientos respecto a la regeneración de brotes por OD a los 90 ddic en el E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	964.587	4	241.147	127.11	0.0000	2384.08	4	596.02	146.98	0.0000
Dentro de grupos	132.8	70	1.89714			283.867	70	4.05524		
Total	1097.39	74				2667.95	74			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

VI.2.4 Comparación entre experimentos

VI.2.4.1 Callogénesis

Cada explante respondió de manera diferente a los cuatro tratamientos para la inducción de callo (Tabla 20), el mayor peso de callo a los 90 ddic en ambas especies se logró en el E3 (ZM de plántulas *ex vitro*) con 0.7451 g y 1.3405 g en As y Am respectivamente (Tabla 20). La inducción de callogénesis se presentó en los tres explantes propuestos, independientemente de la concentración de sales del medio (25 o 100), del nivel de sacarosa (20 o 40) o adición de Vitaminas (L2 o MS).

El tipo de callo encontrado en los mejores tratamientos en el caso de As fue friable de coloración blanco perlado cuando se utilizó como explante el EC (E1) y la ZM de plántulas *in vitro* (E2), resultado similar al encontrado en *A. sisalana* (Das, 1992) donde se obtuvieron callos friables, por el contrario, al utilizar la ZM de plántulas *ex vitro* (E3) se encontraron callos compactos o compactos amarillentos resultado similar al reportado por Romero (2005) en *Agave atrovirens*. Esto se debe a que diferentes tipos de explantes producen callos morfológicamente diferentes (Hazra *et al*., 2002), además, se ha observado mayor variabilidad de callos en medios suplementados con BA, encontrándose callos friables, compactos y con cubierta mucilaginosa (Puente-Garza *et al*., 2015), mismos que se formaron en esta investigación.

El tipo de callo friable fue el predominante en el mejor tratamiento (5.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 3.0 mg L^{-1} de BA) en Am para los tres experimentos, lo que concuerda con lo reportado en *Agave angustifolia* por Nava-Becerril y Arzate-Fernández (2015) utilizando como explante el embrión cigótico de la semilla y con las mismas concentraciones de RCV, con nuestros resultados se amplía el efecto de este tratamiento en otros tipos de explante como lo es la ZM.

Cabe mencionar que se logró la inducción de callogénesis a concentraciones iguales de RCV; 0.1 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.1 mg L^{-1} de BA utilizando la ZM de plántulas *in vitro* y *ex vitro* (E2 y E3) en ambas especies, resultado similar encontrado por Yépez *et al.* (2002); no así en el embrión cigótico (E1). Además, con esto se

comprueba que no es necesaria la adición de agua de coco para la generación de callo como lo menciona Binh *et al*. (1990) en su investigación.

El porcentaje de callogénesis fue variable entre cada experimento probado, siendo más homogéneo en el E1 donde se obtuvo el 100% en la mayoría de los tratamientos a excepción del T1, mientras que en el E2 y E3 este valor fue sumamente dependiente del explante, especie y tratamiento. Aún que, los mejores porcentajes de inducción de callo coinciden con los mejores resultados obtenidos en el peso de callo. En esta investigación la ZM de ambas especies independientemente de su edad está fuertemente influenciada por las concentraciones de ambos RCV.

El T3 (3.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 1.0 mg L^{-1} de BA) probado para la inducción de callo embriogénico en *Agave angustifolia* (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011) donde obtuvieron callos de color blanco-cremoso, de consistencia suave y friable, contrastó con los resultados obtenidos en esta investigación donde la mayoría de los callos obtenidos fueron compactos amarillentos.

En el caso de Am a mayor concentración de 2.4-D aumenta el peso de callo en todos los experimentos probados, contrario a la citocinina BA ya que el T2 que contenía 15 mg L^{-1} de este RCV no mostró un efecto significativo en el peso de callo de esta especie. La especie As muestra un comportamiento totalmente opuesto, ya

que a menor concentración de 2,4-D y adicionando una alta concentración de BA (15 mg L^{-1}) se obtuvo un mayor peso de callo.

Esta investigación contrasta con los experimentos realizados por Das (1992): Hazra *et al*. (2002), donde la luz fue un factor indispensable para la formación de callo, puesto que en condiciones de oscuridad se obtuvo la inducción de callo, lo que nos permite hacer más eficaces los procesos al reducir el consumo de energía eléctrica. Además la adición de 2,4-D mejora el estímulo morfogenético de los explantes cultivados en oscuridad, debido a que la degradación de esta auxina es más lenta en estas condiciones (Arzate-Fernández *et al*. 1997). El comportamiento de los explantes de ambas especies en todos los experimentos probados para la inducción de callo se muestran en la Tabla 20; los callos obtenidos en los mejores tratamientos de ambas especie en cada experimento se pueden observar en la Figura 14.

El análisis de varianza muestra que existen diferencias significativas entre los tres experimentos en la inducción de callo de ambas especies (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis de varianza para evaluar los tratamientos de inducción de callo en el experimento E1, E2 y E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	13.2304	11	1.20276	160.98	0.0000	31.8956	11	2.8996	135.22	0.0000
Dentro de grupos	1.25523	168	0.0074716			3.60244	168	0.0214431		
Total	14.4856	179				35.498	179			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

Tabla 20. Análisis de las variables evaluadas para la inducción de callogénesis en el experimento E1, E2 y E3 de *A. salmiana* y *A. marmorata* en los diferentes tratamientos probados bajo condiciones de obscuridad.

NE	Especie	T	TC 30 ddic	TC 60 ddic	TC 90 ddic	Callogénesis (%)	Peso de callo (promedio en g)
1	*A. salmiana*	1	-	-	-	-	-
		2	C	F	F	100	0.2464[a]
		3	C	C	C	100	0.0841[b]
		4	C	C	C	100	0.0714[c]
	A. marmorata	1	-	-	-	-	-
		2	C	C A	CA	100	0.2386[b]
		3	CA	CA	CA	100	0.3121[b]
		4	F	F	F	100	0.8168[a]
2	*A. salmiana*	1	M	M	M	100	0.2841[ab]
		2	F	F	FO	70	0.3267[a]
		3	F	F	F	20	0.0874[b]
		4	C	CO	CO	20	0.0808[b]
	A. marmorata	1	F	FO	FO	33.3	0.0572[c]
		2	C	C	CO	46.6	0.0776[c]
		3	CA	CA	CA	100	0.5544[b]
		4	F	F	F	100	0.7173[a]
3	*A. salmiana*	1	C	C	C	60	0.3006[b]
		2	C	C	C	93.33	0.7008[a]
		3	CA	CA	CA	60	0.4006[b]
		4	C	O	N	-	-
	A. marmorata	1	C	O	N	-	-
		2	C	C	C	16.6	0.2472[bc]
		3	C	C	C	60	0.4405[b]
		4	F	F	F	80	1.0870[a]

Número de experimento (NE); tratamiento (T); tipo de callo (TC); callo friable (F); callo compacto (C); callo amarillento (CA); callo mucilaginoso (M); callo friable con ligera oxidación (FO).
Callo oxidado (O) Callo necrosado (N) Mucilaginoso (M)

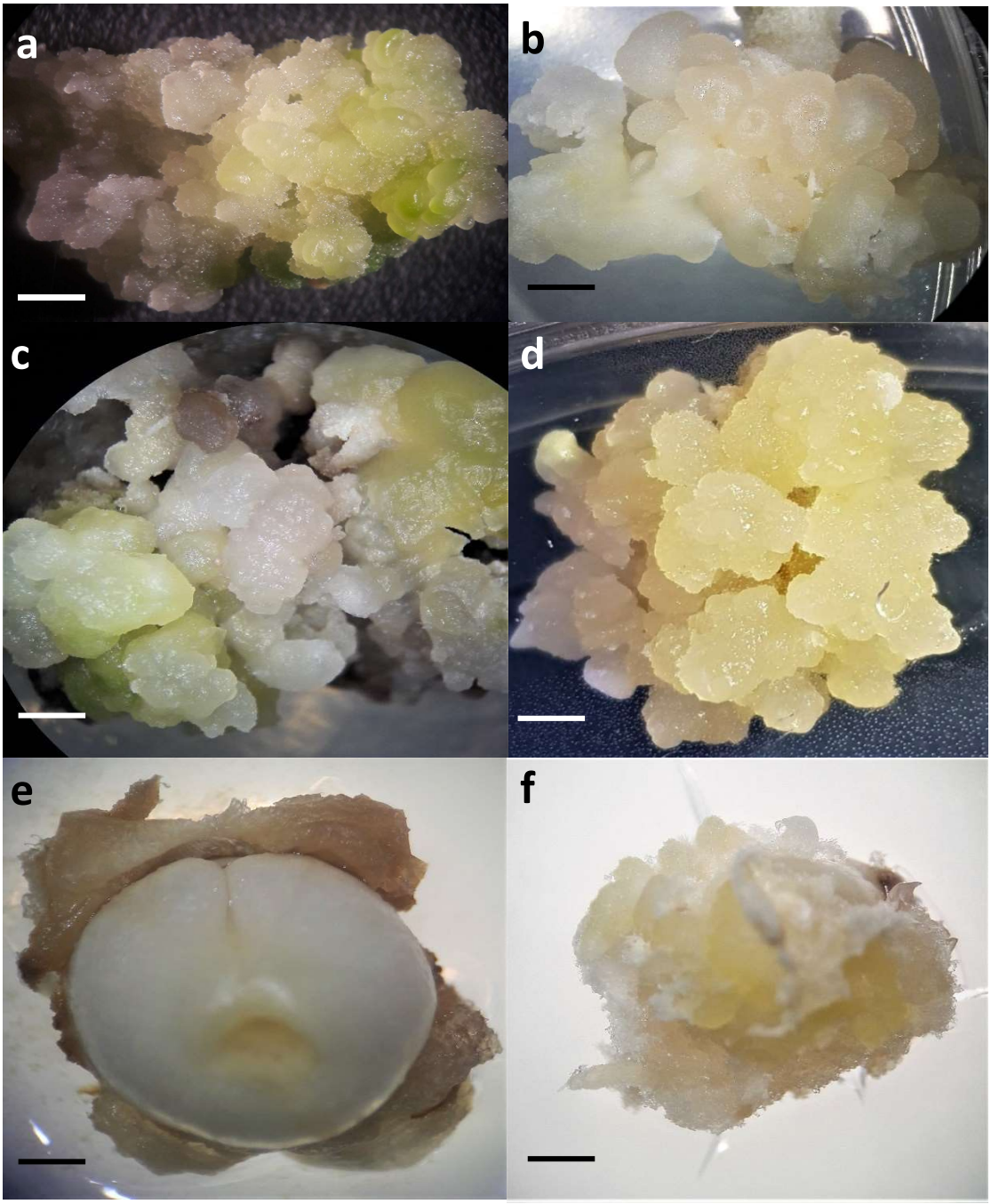

Figura 14. Callos obtenidos de *A. salmiana* con una concentración de 1 mg L^{-1} de 2,4-D y 15 mg L^{-1} de BA en el E1 (a), E2 (c) y E3 (e); callos obtenidos de *A. marmorata* con una concentración de 5 mgL^{-1} de 2,4-D y 3 mg L^{-1} de BA en el E1 (b), E2 (d) y E3 (f). Barra= 1mm.

VI.2.4.2 Organogénesis indirecta

La inducción de brotación fue nula en los tratamientos que no contenían BA. En As el mayor número de brotes se obtuvo con una concentración de 10 mg L^{-1} de BA (T5) en el E1, E2 y E3. El mayor número de brotes obtenidos en As fue 20.6 brotes/explante obtenidos en el E1 (Figura 15a) utilizando como explante el embrión cigótico de la semilla. Como se puede apreciar en la Tabla 25 la acción de la citocinina BA es determinante para la obtención del número de brotes en esta especie, ya que, aumentando la concentración de BA de 5 mg L^{-1} a 10 mg L^{-1} se duplica o triplica el número de brotes en la mayoría de los tratamientos. Se presentó una correlación entre los callos obtenidos en los mejores tratamientos y su posterior organogénesis.

El mayor número de brotes obtenidos en Am fue en el tratamiento que contenía 5 mg L^{-1} de BA(T4) en todos los experimentos (Tabla 25), el mejor explante para la inducción de brotes fue el embrión cigótico (E1) con 24.7 brotes/explante. Contrastante con As en Am el aumento de BA no favoreció la generación de más brotes, por el contrario, mermo el número de estos o como fue el caso del E1 los brotes obtenidos presentaron vitrificación. Por lo antes mencionado se afirma que el mejor explante para la inducción de brotes vía organogénesis indirecta es el embrión cigótico en ambas especies de *Agave*.

Se alcanzó el mayor número de brotes de los mejores tratamientos obtenidos en la inducción de callo en los tres experimentos para ambas especies, por lo que se puede afirmar que existe una relación entre el peso, tipo de callo y su posterior respuesta a la inducción de brotes.

En todos los experimentos la longitud de los brotes para As fue similar, con un promedio de 1.3-2.7 cm. En el mejor tratamiento (10 mg L^{-1} de BA) la mayor longitud se obtuvo usando como explante el EC (E1) con 2.2 cm en promedio. En Am los brotes con la longitud más pequeña se obtuvieron en el E1 (0.2-1.6 cm), mientras que en el E2 y E3 la longitud fue similar siendo de 1.6-2.8 cm en promedio.

La relación auxina/citocinina durante el cultivo *in vitro* puede jugar una función critica para inducir la respuesta morfogenética de las especies de *Agave* (Ramírez-Malagón *et al*., 2008).

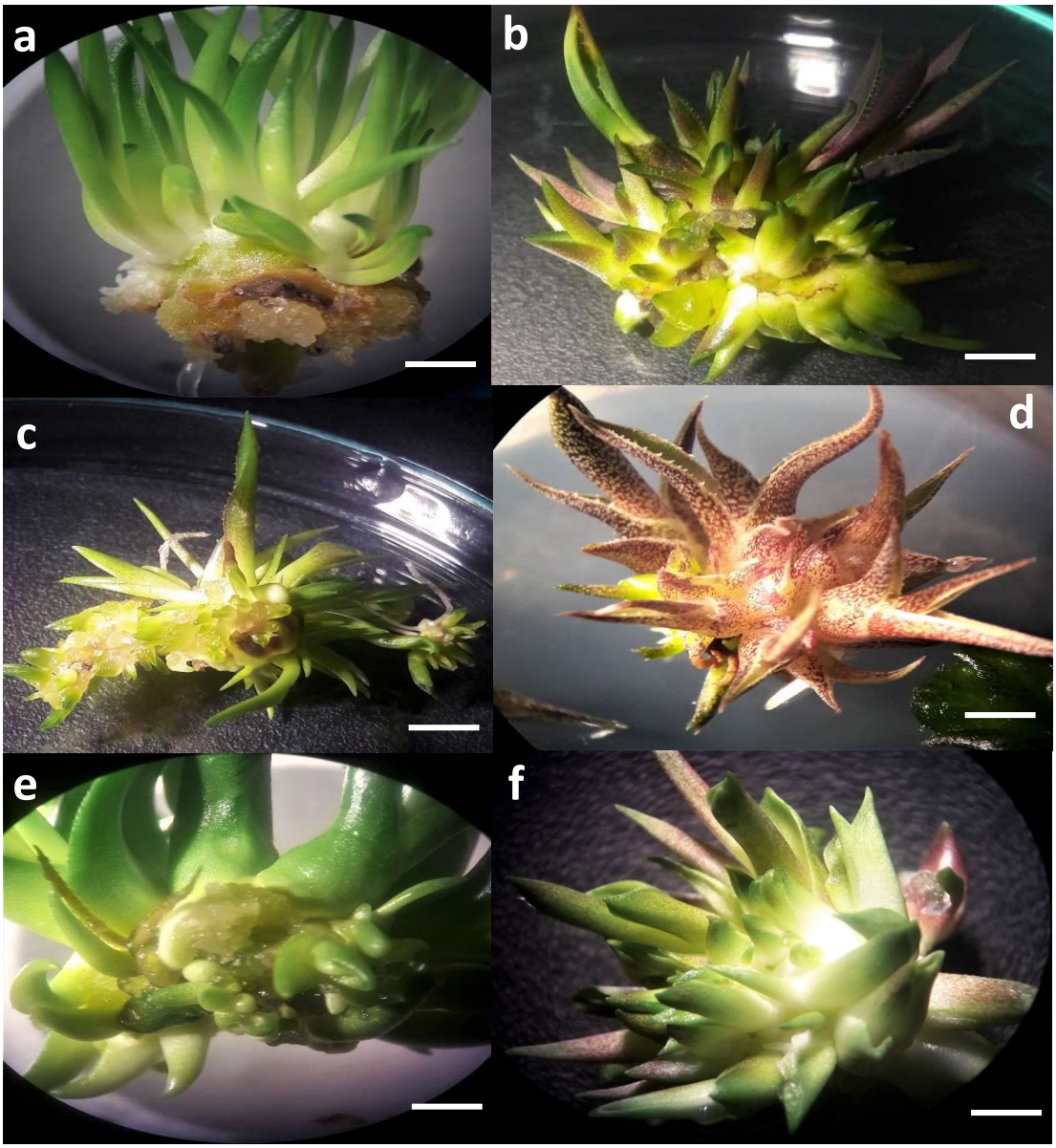

Figura 15. Brotes obtenidos vía OI de *A. salmiana* en un medio con 10 mg L^{-1} de BA en el E1(a), E2 (c) y E3 (e); brotes obtenidos de *A. marmorata* en un medio con 5 mg L^{-1} de BA en el E1 (b), E2 (d) y E3 (f). Barra = 1cm.

El análisis de los resultados de la regeneración de brotes de los tres experimentos en las dos especies se muestra en la Tabla 25; la Figura 15 muestra un explante representativo del mejor tratamiento en cada experimento de ambas especies.

El análisis estadístico muestra que existieron diferencias significativas entre los experimentos empleados en la inducción de brotes vía organogénesis indirecta (Tabla 21).

Tabla 21 Análisis de varianza para evaluar los tratamientos de organogénesis indirecta del experimento E1, E2 y E3 de *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	11182.5	9	1242.5	393.43	0.0000	12749.6	9	1416.63	358.03	0.0000
Dentro de grupos	679.0	215	3.15814			850.7	215	3.95674		
Total	11861.5	224				13600.3	224			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

Tabla 22. Comparación de medias del número y longitud de brotes obtenidos en el experimento E1, E2 y E3 en ambas especies de *Agave.*

				Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
	Callogénesis (90 d)		OI (45 d)	As		Am		As		Am		As		Am	
T	2,4-D (mg/L^{-1})	BA (mg/L^{-1})	BA (mg/L^{-1})	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)
T1TB1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0^{l}	0.0	0.0^{m}	0.0	0.0^{k}	0.0	0.0^{k}	0.0
T1TB2	0.1	0.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0^{ji}	2.7	0.0^{m}	0.0	0.5^{kj}	2.3	0.6^{kj}	2.7
T1TB3	0.1	0.1	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7^{kj}	2.7	1.2^{lk}	2.8	1.4^{ihg}	2.3	1.5^{jih}	2.4
T1TB4	0.1	0.1	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4^{lk}	2.7	2.1^{j}	2.3	2.3^{f}	2.3	2.1^{ihg}	2.4
T1TB5	0.1	0.1	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5^{ih}	2.3	2.7^{i}	2.0	1.7^{hgf}	2.3	3.0^{hg}	2.3
T2TB1	1.0	15.0	0.0	0.0^{g}	0.0	0.0^{j}	0.0	0.0^{l}	0.0	0.0^{m}	0.0	0.0^{k}	0.0	0.0^{k}	0.0
T2TB2	1.0	15.0	3.0	4.5^{cde}	1.8	3.5^{hi}	16.4	3.6^{ed}	1.8	0.7^{l}	2.8	0.9^{ji}	2.3	0.7^{kj}	2.7
T2TB3	1.0	15.0	4.0	4.6^{cde}	1.8	7.5^{fg}	10.7	4.7^{c}	1.7	1.6^{kj}	2.3	2.3^{fe}	2.3	1.3^{ji}	2.7
T2TB4	1.0	15.0	5.0	6.6^{c}	1.4	5.5^{gh}	14.0	5.4^{b}	1.7	3.1^{g}	2.0	6.1^{c}	2.2	1.9^{ih}	2.4
T2TB5	1.0	15.0	10.0	20.6^{a}	1.2	12.0^{e}	9.7	18.4^{a}	1.3	3.7^{f}	1.7	13.8^{a}	2.0	4.7^{e}	2.0
T3TB1	3.0	1.0	0.0	0.0^{g}	0.0	0.0^{j}	0.0	0.0^{l}	0.0	0.0^{m}	0.0	0.0^{k}	0.0	0.0^{k}	0.0
T3TB2	3.0	1.0	3.0	1.5^{fg}	2.6	5.0^{gh}	12.9	1.1^{ji}	2.8	1.7^{kj}	2.3	0.9^{ji}	2.3	1.7^{ih}	2.4
T3TB3	3.0	1.0	4.0	0.5^{fg}	2.8	13.2^{de}	8.5	1.7^{h}	2.3	2.9^{h}	2.0	1.8^{gf}	2.3	3.7^{g}	2.1
T3TB4	3.0	1.0	5.0	0.2^{g}	2.8	17.8^{c}	6.6	2.3^{g}	2.3	4.7^{e}	1.7	3.5^{d}	1.8	5.4^{d}	2.0
T3TB5	3.0	1.0	10.0	16.2^{b}	1.4	17.8^{b}	6.6	3.5^{e}	1.8	5.7^{d}	1.7	6.6^{cb}	2.1	8.9^{c}	2.1
T4TB1	5.0	3.0	0.0	0.0^{g}	0.0	0.0^{j}	0.0	0.0^{l}	0.0	0.0^{m}	0.0	0.0^{k}	0.0	0.0^{k}	0.0
T4TB2	5.0	3.0	3.0	2.3^{efg}	2.6	10.0^{ef}	10.6	1.0^{ji}	2.8	2.0^{j}	2.3	0.9^{ji}	2.3	2.4^{ih}	2.4
T4TB3	5.0	3.0	4.0	2.7^{def}	2.4	16.0^{cd}	7.9	1.7^{h}	2.3	6.9^{c}	1.8	1.4^{hi}	2.3	4.1^{f}	2.1
T4TB4	5.0	3.0	5.0	4.8^{cd}	1.8	24.7^{a}	6.0	2.9^{f}	2.0	11.3^{a}	1.9	3.0^{ed}	2.2	12.5^{a}	1.7
T4TB5	5.0	3.0	10.0	14.3^{b}	1.4	26.7^{a}	6.2	4.1^{d}	1.8	9.9^{b}	1.6	6.9^{b}	2.1	10.1^{b}	2.4

LB= longitud de brote; NB= número de brote; T= tratamiento; TB= tratamiento utilizado para inducir brotes.

VI.2.4.3 Organogénesis directa

Como se observa en la Tabla 24 los mejores resultados en cuanto al número de brotes en ambas especies se obtuvieron al utilizar como explante la ZM de plántulas *in vitro* (E2), siendo la concentración de 10 mg L^{-1} de BA (T5) la mejor para As con 23.8 brotes/explante y la concentración de 5 mg L^{-1} de BA (T4) para Am con 22.3 brotes/explante.

Esta investigación difiere con algunos autores (Groenewald, 1976; Powers y Backhaus, 1989; Robert *et al.*, 1987) que lograron la inducción de brotes mediante una combinación de auxinas y citocininas, ya que en este trabajo el uso de BA fue suficiente para generar brotes sin pasar por una etapa de callo. Sin embargo, se requirieron altas concentraciones de BA para obtener una mejor respuesta, concordando con Das, (1992).

En la Tabla 23 podemos observar el análisis de varianza entre ambos experimentos, donde se muestra que existieron diferencias significativas entre los explantes utilizados en cada experimento.

Tabla 23. Análisis de varianza para evaluar los tratamientos respecto a la regeneración de brotes por OD entre el experimento E2 y E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

	Agave salmiana					*Agave marmorata*				
Fuente de variación	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*	*SC*	*gL*	*CM*	*F*	*Valor de P*
Entre grupos	11182.5	9	1242.5	393.43	0.0000	12749.6	9	1416.63	358.03	0.0000
Dentro de grupos	679.0	215	3.15814			850.7	215	3.95674		
Total	11861.5	224				13600.3	224			

SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado de la media; gL= grados de libertad

Tabla 24. Comparación de medias del número y longitud de brotes obtenidos en el experimento E2 y E3, vía OD en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

		Experimento 2				Experimento 3			
T	BA (mg L^{-1})	As		Am		As		Am	
		NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)
T1	0.0	0.0^{e}	0.0	0.0^{e}	0.0	0.0^{d}	0.0	0.0^{e}	0.0
T2	3.0	7.8^{d}	1.7	4.1^{d}	1.8	1.1^{c}	1.7	4.5^{d}	1.8
T3	4.0	6.7^{c}	1.5	8.3^{c}	1.3	6.3^{b}	1.7	8.2^{c}	3.0
T4	5.0	8.3^{b}	1.6	22.3^{b}	1.7	8.3^{a}	1.6	14.7^{a}	3.7
T5	10.0	23.8^{a}	1.6	17.0^{a}	2.1	8.4^{a}	2.2	14.2^{ab}	2.2

NB= número de brotes; LB= longitud de brotes; T= tratamiento

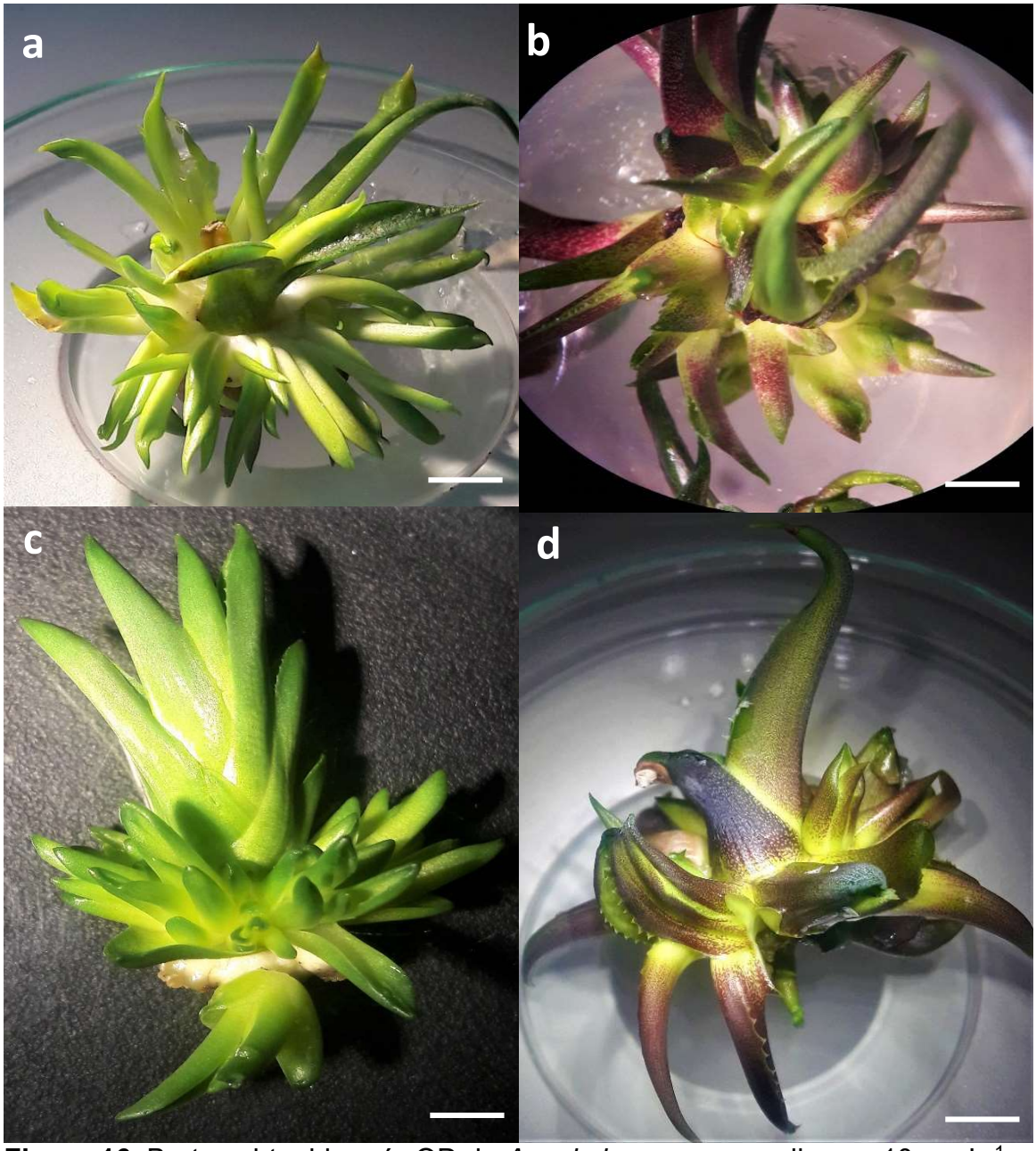

Figura 16. Brotes obtenidos vía OD de *A. salmiana* en un medio con 10 mg L^{-1} de BA en el E2 (a) y E3 (c); brotes obtenidos en *A. marmorata* en un medio con 5 mg L^{-1} de BA en el E2 (b) y E3 (d). Barra = 1mm.

VI.2.4.4 Organogénesis indirecta *vs* organogénesis directa

Los brotes regenerados fueron heterogéneos en tamaño en ambas especies y en todos los experimentos, el mayor número de brotes encontrado en As se indujo con la técnica de organogénesis directa utilizando como explante la ZM de plántulas *in vitro* (E2) obteniendo 23.8 brotes/explante, lo anterior contrasta con lo mencionado por Malda y Luz (2004), en *Agave salmiana* y *A. mapisaga*, ellos consiguieron mejores resultados utilizando semillas no así al explante de rizomas resultado similar al encontrado en Am donde el mayor número de brotes se encontró utilizando el embrión cigótico bajo la técnica de organogénesis indirecta (E1) alcanzando 26.7 brotes/explante.

Esta investigación concuerda con diferentes autores al mencionar que el Agave requiere altas concentraciones de citocininas para inducir brotación, ya que para ambas especies la concentración alta de BA fue la que favoreció la regeneración de brotes (Robert *et al*. 1987).

Cabe mencionar, que a pesar del importante resultado obtenido mediante la técnica de organogénesis indirecta se debe considerar el tiempo de la obtención de estos explantes, ya que pasaron 150 días hasta la obtención de brotes (90 días para la formación de callo más 60 días en los medios de inducción de brotes), por el contrario los explantes mediante organogénesis directa se obtuvieron en tan solo 60 días, lo que escalado a nivel comercial brinda la oportunidad de bajar costos,

obtener brotes en un tiempo corto y con un menor riesgo de variabilidad genética en las plantas generadas.

La baja tasa de brotación encontrada al usar como explante la ZM de plántulas *ex vitro* de seis meses comparada con los otros explante utilizados puede deberse a que los tejidos juveniles presentan una mayor aptitud para la morfogénesis que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes (Domínguez-Rosales *et al*., 2008; Picca *et al*., 2004). Por lo antes mencionado se concuerda con Hazra *et al*. (2002) al mencionar que la generación de brotes depende del origen del explante.

Nuestros resultados confirman que cada especie de *Agave* responde de manera diferente a los RCV suministrados *in vitro*, por lo cual resulta indispensable el desarrollo de protocolos de propagación particulares para cada una de ellas (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008; Ramírez-Malagón *et al*., 2008).

En la Tabla 25 se muestra un resumen de las concentraciones que mejores resultados arrojaron en los tres experimentos, como vemos las mejores concentraciones fueron las mismas para el E1, E2 y E3, sin embargo los resultados arrojados en cada uno de ellos fueron totalmente diferentes, esto puede deberse a las cantidades endógenas de RCV que contiene los diferentes explantes utilizados. Afirmando una vez más que el resultado dependerá del explante, especie, técnica de cultivo y cantidad de RCV añadidos al medio de cultivo.

Tabla 25. Mejores tratamientos del experimento E1, E2 y E3 en *A. salmiana* y *A. marmorata*.

Experimento	Callogénesis		Organogénesis indirecta		Organogénesis directa	
	As	Am	As	Am	As	Am
	2,4-D/BA (mg L^{-1})			BA (mg L^{-1})		
E1	1.0/15.0	5.0/3.0	10.0	5.0	N/A	N/A
E2	1.0/15.0	5.0/3.0	10.0	5.0	10.0	5.0
E3	1.0/15.0	5.0/3.0	10.0	5.0	5.0 ó 10.0	5.0

Todos los brotes obtenidos del E1, E2 y E3 a los 45 días después de iniciada la aclimatación (ddia) fueron separados y transferidos al medio de crecimiento el cual no fue adicionado con ningún RCV (Tabla 4), donde permanecieron 30 días, los datos de las medidas alcanzadas por los brotes su muestran en la Tabla 26. En ambas especies los brotes alcanzaron de 2-4 cm de altura, el crecimiento de raíces vario respecto al experimento y la especie.

VI.3 Aclimatación de plantas

El enraizamiento de las plántulas regeneradas se logró en un medio basal sin reguladores del crecimiento (Figura 17a y b) a excepción del E3 en donde no se observó enraizamiento; con resultados de 5% As fue la única especie que enraizó en el E1. Con eficiencias de 10 a 20% en As y 5 a 20% en Am el E2 fue el que mejor respondió a la etapa de aclimatación, resultados similares se han reportado para *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989), *A. parrasana* Berger (Santacruz-Ruvalcaba *et al*., 1999), *A. victoria-reginae* (Martínez-Palacios *et al*., 2003), *A. fourcroydes* y *A. sisalana* (Binh *et al*., 1990), lo anterior puede suceder, debido a que en las hojas ocurre la síntesis de auxinas (Raven *et al*., 1999). Por el contrario, Silos-Espino *et al*. (2007) recomienda la adición de la auxina ácido indolacético (AIA) para *A. salmiana*, en la misma especie Puente-Garza *et al.* (2015), obtuvieron un 100% de enraizamiento en un medio libre de RCV más vitaminas L2. En algunas especies sólo es necesario agregar al medio de cultivo auxinas o bien carbón activado con el fin de estimular la generación de raíces (Domínguez-Rosales *et al*., 2008).

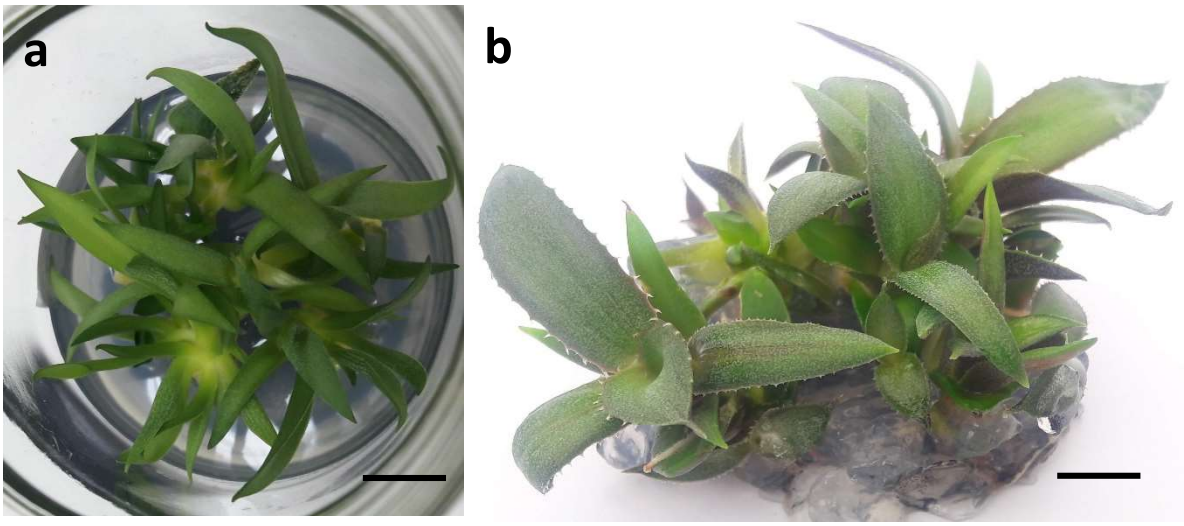

Figura 17 Aspecto de las plántulas de *A. salmiana* (a) y *A. marmorata* (b), a los 45 ddic en el medio sin RCV.

El porcentaje restante de las plántulas del E1, E2 y E3 no emitieron raíz alguna, sin embargo se debe tener en cuenta lo planteado por Fujii *et al*. (1990) quienes mencionan que la habilidad de obtener plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *in vitro*. Sin embargo, Caraballo *et al*. (2010) menciona que altas concentraciones de citocinina en el medio de cultivo inhiben la formación de raíces, tomando en cuenta que los mejores tratamientos para la regeneración de brotes en todos los experimentos y en ambas especies contenían niveles altos de citocinina (Tabla 24), este pudo ser un factor determinante para el bajo porcentaje obtenido de raíces en los tres experimentos.

El uso de la espuma fenólica como sustrato favoreció el crecimiento multidireccional de las raíces (Figura 19a), además al distribuir homogéneamente la humedad en todo el volumen de los plugs permitió no tener un exceso de agua en los explantes (Figura 18), lo cual es un factor determinante en la aclimatación de plántulas *in vitro*,

ya que éstas se muestran resistentes al déficit de agua más no a su exceso (Binh *et al*., 1990).

La solución que contenía Phyto Raizon® Plus mostró una respuesta superior en la formación de raíces (Figura 19d), crecimiento de brotes y porcentaje de supervivencia en ambas especies, lo cual sugiere que la concentración de auxinas exógenas fue complementaría a las auxinas endógenas de cada plántula para estimular una respuesta de formación de raíces y mejor adaptación. Se puede ver en la Tabla 26 que en la Solución 2, el crecimiento de las plántulas aclimatadas a los 30 ddia incrementó arriba de 1.0 cm en todos los experimentos, el porcentaje de supervivencia en ambas soluciones fue eficiente, sin embargo en la solución 2 se observó una mejoría notable teniendo el 100% de supervivencia en siete de los diez tratamientos. Se ha reportado la aclimatación exitosa de *A. marmorata* utilizando como sustrato una base de peat most con agrolita (Aguilar y Rodríguez De la O, 2018). No se ha reportado el uso de espuma fenólica en la aclimatación de especies de *Agave*.

Es importante el aporte de nutrimientos mediante fertilización, Uvalle y Vélez (2007) en su experimento de nutrición con la especie *Agave tequilana* Weber va. Azul menciona que la aplicación de fertilización aumentó la capacidad fotosintética para la fijación de CO_2 y la acumulación de biomasa de las plantas regeneradas.

Cuatro semanas de aclimatación fueron suficientes para que entre el 20-75% de las plántulas formaran raíces. El número de raíces fue mayor en la S1 donde el promedio osciló entre 2.17-4.18 resultado por debajo a lo encontrado en *A. fourcroydes* (Abreu *et al*., 2007) donde a los 30 ddia obtuvieron 4.8 raices/explante en promedio. La longitud de la raíz fue muy similar en ambas soluciones, oscilando en los 3.0 cm en ambas especies de *Agave*.

A los 30 ddia las plántulas se transfirieron en maceta y en un sistema hidropónico (Figura 19).

Figura 18. Plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* del experimento E1, E2 y E3 en la charola con plugs de espuma fenólica a los 30 ddia.

Abreu *et al*. (2007) menciona que la propuesta de una etapa intermedia entre la aclimatación y el vivero permite preparar a la vitroplanta, para soportar los rigores de las condiciones de campo en un ambiente menos agresivo y lograr un desarrollo adecuado, que le permita en un tiempo mínimo alcanzar el patrón de calidad.

Después de 60 días de la aclimatación de las plántulas en invernadero se observó en ambas especies que algunas plántulas perdían la hoja más vieja (Figura 19b y e), esto sugiere que durante el proceso de aclimatación la perdida de hojas se favorece, debido al lógico estrés producido cuando las plántulas son transferidas a condiciones *ex vitro*, resultado similar al encontrado en *A. fourcroydes* Lem (Abreu *et al*., 2007). De acuerdo con Tadeo (2000) una de las respuestas específicas de las plantas a los cambios externos es deshacerse de las partes no esenciales y recuperar los nutrientes presentes en esas partes, de las que se deshace, para dirigirlos hacia otros órganos.

Figura 19. Plántula *ex vitro* después de 30 días de aclimatación de *A. salmiana* y *A. marmorata*; As en un plug de espuma fenólica(a), plántula enraizada de Am (d). Plántula aclimatada a los 30 días en el sistema hidropónico de As (b) y Am (e). Plántula aclimatada a los 30 días en maceta de As(c) y Am (f).

Con los resultados expuestos en la Tabla 26 podemos decir que el proceso de aclimatación fue satisfactorio, ya que las plantas mostraron un reinicio de crecimiento en ambos sistemas (hidropónico y maceta).

Se tienen antecedentes de la aclimatación exitosa (94-100%) de diversas especies de *Agave*: *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al*., 2006); *A. cocui* (Salazar *et al*., 2009); *A. fourcroydes* (Garriga *et al*., 2010); *A. americana* (Enríquez *et al*., 2013).

Tabla 26. Resultados de las variables evaluadas a los 30 ddia de las plántulas regeneradas de *A. salmiana* y *A. marmorata.*

E	P	Es	Solución 1									Solución 2								
			LB (cm)		C (cm)	R (%)		NR	LR (cm)		S (%)	LB (cm)		C (cm)	R (%)		NR	LR (cm)		S (%)
			1 d	30 d		1 d	30 d	30 d	1 d	30 d	30 d	1 d	30 d		1 d	30 d	30 d	1 d	30 d	30 d
E1	OI	As	4.74	6.24	1.50	5	55	2.67	2.8	2.07	75	4.13	5.55	1.43	5	70	3.33	1.3	2.16	70
		Am	2.90	3.76	0.86	0	55	4.09	0	3.27	95	3.05	4.50	1.46	0	75	2.73	0	3.11	80
E2	OD	As	4.36	4.98	0.62	20	30	2.17	2.00	2.95	90	3.50	4.68	1.18	20	50	2.30	0	1.55	100
		Am	2.43	3.34	0.91	10	60	3.75	2.35	2.40	90	2.79	4.11	1.33	10	65	2.10	0	3.07	100
	OI	As	4.58	5.17	0.59	20	20	3.25	2.43	3.13	95	4.04	5.33	1.29	20	55	2.00	0	2.24	100
		Am	2.15	3.06	0.91	5	50	3.30	1.40	1.97	100	2.88	3.94	1.06	5	55	2.91	0	1.94	100
E3	OD	As	3.70	4.37	0.67	0	35	3.00	0	2.81	100	3.98	5.16	1.18	0	55	1.88	0	2.16	100
		Am	2.00	3.55	1.55	0	50	3.70	0	2.42	95	2.13	3.17	1.04	0	60	2.50	0	2.23	100
	OI	As	3.40	4.12	0.72	0	40	3.50	0	2.49	100	3.82	5.05	1.23	0	70	2.36	0	2.20	100
		Am	2.27	3.10	0.84	0	55	4.18	0	2.21	95	2.78	4.29	1.52	0	60	3.00	0	1.96	90

E (Experimento); P (Proceso); Es (Especie); OD (Organogénesis directa); OI (Organogénesis indirecta); AS (*Agave salmiana*); AM (*Agave marmorata*); LB (longitud de brotes); C (crecimiento); R (porcentaje de formación de raíz); NR (media de número de raíces); LR (longitud de raíces); S (porcentaje de supervivencia).

VI.4 Evaluación de la variación somaclonal

VI.4.1 Determinación cuantitativa

La medición de pureza del ADN extraído, se realizó mediante espectrofotometría utilizando el rango de luz UV. Se ha reportado que el ADN tiene una absorbancia máxima en 260 nm, mientras que las proteínas, las cuales son las impurezas más comunes en preparaciones de ADN, tienen una absorbancia máxima de 280 nm; esta es la razón por la cual esas dos longitudes de onda son usadas para verificar la pureza del ADN. Si la relación está entre 1.7 y 2.0 entonces la preparación de ADN es considerada pura, una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas y una relación mayor indica presencia de ARN (Müller y Schweizer 1994; Weir *et al.,* 1996).

Según Alberts *et al.* (2004), el estado físico de los ácidos nucleicos está relacionado con la absorbancia que es la capacidad de absorción de la luz ultravioleta (UV), para la molécula de ADN el menor grado de absorción se produce en estado de doble hélice, la absorción aumenta cuando se produce la desnaturalización pasando a estado de hélice sencilla (efecto hipercrómico, aumento de la absorbancia) y, por último, si degradamos este ADN de hélice sencilla a nivel de nucleótidos libres, de nuevo aumenta la absorbancia, por lo que a menor absorbancia mayor integridad.

En el presente estudio, los resultados de la concentración (ng μL^{-1}), así como la relación (A_{260}/A_{280} nm) para cada una de las muestras de ambas especies de *Agave* se muestran en la Tabla 25; donde se observa una estimación de la pureza del ADN por medio de la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} nm.

Las relaciones de absorbancia entre 260 a 280 nm variaron desde 1.4 a 2.0, solo dos muestras arrojaron valores arriba de 2.0 (ambas pertenecientes al E2); la primera E2OIC1 mostró un coeficiente de 2.41 y en la segunda E2ODC1 se registró un valor de 2.03, lo que sugiere contaminación por una alta cantidad de ARN.

Las concentraciones oscilaron entre 61.3-366.5 ng μL^{-1} de ADN en solución (Tabla 27). Se obtuvo un promedio de 159.6 ng μL^{-1} de ADN por muestra. Sin embargo, Kean-Galeno (2016) utilizando el mismo protocolo de extracción obtuvo en promedio 13.81 ng μL^{-1} de ADN por muestra en el mismo género de Agave.

Existen diversos factores que afecta la amplificación del ADN mediante técnicas moleculares basadas en PCR, lo cual se manifiesta principalmente en la presencia de falsos positivos. Algunos de los principales factores que afectan la amplificación, son la pureza, integridad y cantidad del ADN extraído, lo cual tiene que ver principalmente con el co-aislamiento de polisacáridos, fenoles y metabolitos secundarios durante la extracción de ADN (Solano-Flórez, 2009).

Tabla 27. Resultados de cuantificación espectrofotométrica de los extractos de ADN obtenidos a partir de las plántulas regeneradas mediante los tres experimentos realizados en este trabajo en *A. salmiana* y *A. marmorata*; mediante la técnica CTAB.

Muestra As	Concentración (ng μL^{-1})	A_{260}/A_{280}	Muestra Am	Concentración (ng μL^{-1})	A_{260}/A_{280}
E1C1	77.5	1.42	E1C1	88.7	1.58
E1C2	181	1.66	E1C2	232.6	1.18
E1C3	180.3	1.48	E1C3	73.2	1.87
E1C4	106.3	1.51	E1C4	92.4	1.56
E1C5	114.2	1.45	E1C5	56.6	1.77
E1C6	178.4	1.70	E1C6	106.7	1.85
E2ODC1	61.3	2.03	E2ODC1	111.6	1.48
E2ODC2	116	1.87	E2ODC2	119.6	1.47
E2ODC3	106.8	1.64	E2ODC3	174.9	1.84
E2OIC1	107.7	2.41	E2OIC1	195.3	1.98
E2OIC2	167.8	1.89	E2OIC2	70.1	1.57
E2OIC3	99.7	1.51	E2OIC3	190.2	1.87
E3ODC1	231	1.41	E3ODC1	82.6	1.74
E3ODC2	236	1.67	E3ODC2	93.6	1.42
E3ODC3	246.7	1.52	E3ODC3	202.3	1.51
E3OIC1	217.1	1.54	E3OIC1	264.4	1.43
E3OIC2	366.5	1.47	E3OIC2	181.1	1.22
E3OIC3	257	1.53	E3OIC3	183.7	1.57

VI.4.2 Amplificación de ADN

En este estudio se demostró que el ADN de *A. salmiana* y *A. marmorata*, se pudo amplificar selectivamente por PCR con el uso de las diferentes combinaciones de primers, lo que indicó lo satisfactorio del método de extracción de ADN empleado.

El análisis del porcentaje de diferencias entre los explantes obtenidos se hizo por separado en cada uno de los experimentos.

VI.4.2.1 Experimento 1

Con la técnica RAPD, el número total de bandas reproducible de ambas especies fue de 10 (Tabla 28 y 29), Sin embargo, en el caso de los primers tipo ASSR se observaron 25 bandas totales en As y 9 en Am. Solo en As se observaron tres bandas específicas; una con el RAPD Y41 (1250 pb) y dos con los ASSR; la banda fue amplificada por el primer ASSR20 con un peso de 925 pb, la segunda encontrada por el primer ASSR29 y pesó 1125 pb.

Los tamaños de los fragmentos amplificados por RAPD en las dos especies oscilaron entre 400-1500 pb. Lo anterior, concuerda con lo reportado en la literatura (< 2000 pb) cuando esta técnica es utilizada en estudios similares en otras especies de plantas (Yah-Chulim, 2011).

Se encontró un alto porcentaje de polimorfismo en las dos especies con ambas técnicas moleculares. Con la técnica RAPD se encontró un promedio de 69.04% de polimorfismo en As y un 90% en Am. Mientras que los ASSR mostraron un 96.15% de polimorfismo en promedio en As y un 46.42% en Am (Tabla 28 y 29).

Tabla 28. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud de plantas regeneradas por OI en el E1 de *Agave salmiana*.

Iniciador	Bandas totales	Bandas monomórficas	Bandas específicas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo	Tamaño (pb)
Y24	7	2	0	5	71.42	400-1500
Y41	3	2	1	2	66.66	400-1500
Promedio	5	2	0.50	3.5	69.04	1150
Total	10	4	1	7	-	-
ASSR20	13	1	1	12	92.30	400-2000
ASSR29	12	-	1	12	100	800-1500
Promedio	12.5	0.5	0.5	12	96.15	1175
Total	25	1	2	24	-	-

Tabla 29. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud de plántulas de *Agave marmorata* regeneradas por OI en el E1.

Iniciador	Bandas totales	Bandas monomórficas	Bandas específicas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo	Tamaño (pb)
Y24	5	1	0	4	80	400-1500
Y41	5	0	0	5	100	400-1000
Promedio	5	0.5	0	4.5	90	825
Total	10	1	0	9	-	-
ASSR20	7	4	0	3	42.85	400-2000
ASSR29	2	1	0	1	50	800-1500
Promedio	4.5	2.5	0	2	46.42	1175
Total	9	5	0	4	-	-

El dendrograma de análisis de agrupamiento UPGMA, de distancia genética (Tabla 30 y 31) basado en las bandas obtenidas con RAPD y ASSR en ambas especies aparece en la Figura 20.

Los resultados muestran la aparición de un grupo en ambas especies, sin embargo en As se formaron dos subgrupos; el primero agrupó a OI1 y OI2 y el segundo agrupó a OI3, OI4, OI5 y OI6 (Figura 20a). Se formaron dos subgrupos en Am; OI1,

OI2, OI3, OI5, OI6, el segundo subgrupo solo fue representado por OI4 (Figura 20b). Lo anterior comprueba la variabilidad detectada entre los clones obtenidos en ambas especies. La máxima distancia genética (D_G), fue de 0.44 en As y en el caso de Am fue de 0.24.

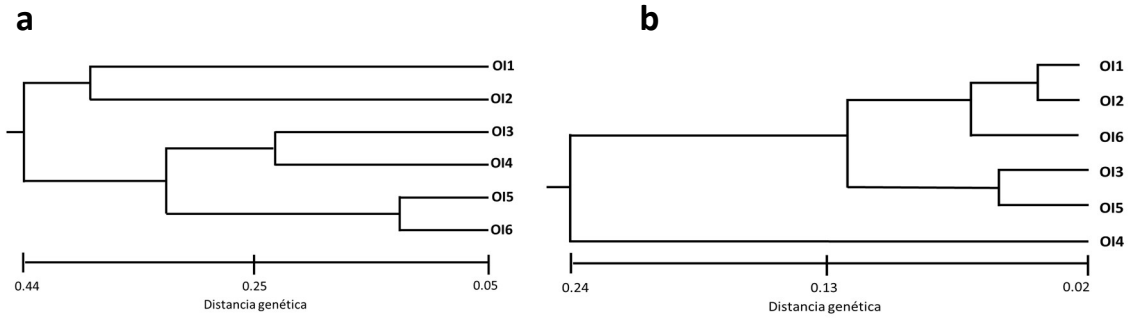

Figura 20. Dendrogramas mostrando el agrupamiento de seis clones de *A. salmiana* (a) y *A. marmorata* (b), respectivamente en el E1 obtenido a partir del análisis con iniciadores RAPD y ASSR basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA.

En cuanto a la diferenciación genética, los resultados obtenidos respecto a la D_G, se muestran en las Tablas 30 y 31, donde se observa la clara diferencia entre los clones obtenidos mediante la organogénesis indirecta utilizando como explante el embrión cigótico de la semilla. Estos resultados, sugieren variación somaclonal, entre los clones de un mismo individuo, y muy probablemente al efecto auxínico del 2,4-D.

Tabla 30. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados del E1 por OI de *Agave salmiana*, usando iniciadores RAPD y ASSR.

No. Clon	OI1	OI2	OI3	OI4	OI5	OI6
OI1	****					
OI2	0.2412	****				
OI3	0.3118	0.1752	****			
OI4	0.4418	0.2877	0.1335	****		
OI5	0.2412	0.2877	0.1752	0.2412	****	
OI6	0.2642	0.2642	0.1542	0.2187	0.0551	****

Tabla 31. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados del E1 por OI de *Agave marmorata*, usando iniciadores RAPD y ASSR.

No. Clon	OI1	OI2	OI3	OI4	OI5	OI6
OI1	****					
OI2	0.0180	****				
OI3	0.1335	0.1133	****			
OI4	0.2412	0.2187	0.1335	****		
OI5	0.0935	0.0741	0.0364	0.1752	****	
OI6	0.0364	0.0551	0.0935	0.2412	0.0551	****

VI.4.2.2 Experimento 2

Con la técnica RAPD se encontró igual número de bandas en las plántulas regeneradas en ambas especies, por el contrario con los marcadores ASSR se encontraron 24 en As y 19 en Am. A diferencia de lo reportado con (Yah-Chulim, 2011), en este estudio para ambas especies con el marcador Y41 amplificaron bandas con un peso de 2500 pb, 500 bases más de lo encontrado en otras especies con este tipo de marcador.

El tamaño de las bandas para ambas especies se encontró en un rango de 300-2500 pb con los marcadores RAPD, mientras que en los ASSR fue de 400-1750 pb (Tabla 32 y 33).

Tabla 32. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud en plántulas regeneradas por OD y OI de *Agave salmiana* del E2.

Iniciador	Bandas totales	Bandas monomórficas	Bandas específicas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo	Tamaño (pb)
Y24	4	4	0	0	0	400-500
Y41	17	5	0	12	70.58	300-2500
Promedio	10.5	4.5	0	6	35.29	925
Total	21	9	0	12	-	-
ASSR20	14	4	0	10	71.42	400-1750
ASSR29	10	10	0	0	0	800-1750
Promedio	12	7	0	5	35.71	1175
Total	24	14	0	10	-	-

Tabla 33. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud en plántulas regeneradas por OD y OI de *Agave marmorata* del E2.

Iniciador	Bandas totales	Bandas monomórficas	Bandas específicas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo	Tamaño (pb)
Y24	8	3	2	5	62.5	400-1500
Y41	13	5	0	9	64.28	200-2500
Promedio	10.5	4	1	7	63.39	1150
Total	21	8	2	14	-	-
ASSR20	7	7	0	0	0	400-1000
ASSR29	12	7	0	5	41.66	400-1500
Promedio	9.5	7	0	2.5	20.83	825
Total	19	14	0	5	-	-

La fidelidad genética se mantuvo en las plántulas regeneradas por organogénesis directa. Por su parte todas las combinaciones con presencia de 2,4-D,

consecuentemente que atravesaron por una fase de callo presentaron variación genética.

Como se puede apreciar en los dendrogramas basados en las bandas obtenidas con ambos tipos de marcadores formaron un grupo, sin embargo en As se formaron dos subgrupos; el primero formado por 1OI y el grupo formado por los explantes de OD (1OD, 2OD, 3OD), los clones 2OI y 3OI formaron el segundo grupo (Figura 21a). De igual manera en Am se formaron tres subgrupos; los clones 1OI y 2OI son parte del primer grupo, el segundo grupo son los clones obtenidos mediante OD, el tercer grupo fue el 3OI (Figura 21b).

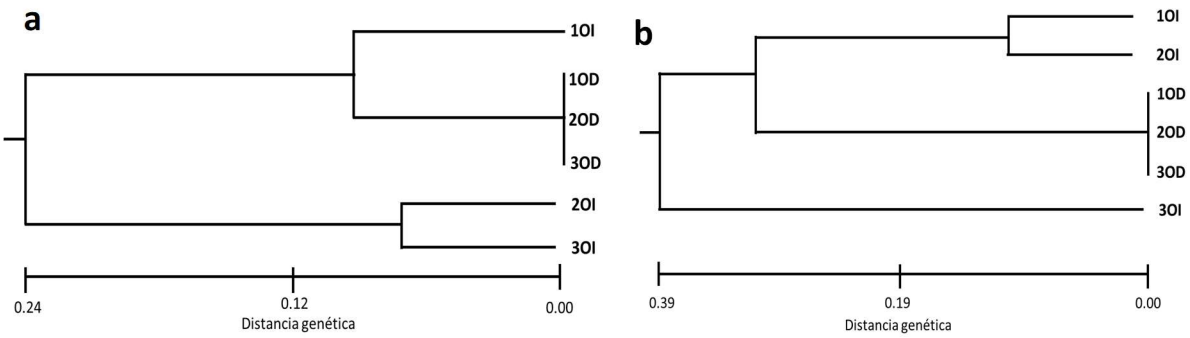

Figura 21. Dendrograma mostrando el agrupamiento de seis clones de *A. salmiana* (a) y *A. marmorata* (b), respectivamente en el E2 obtenidos a partir del análisis con iniciadores RAPD y ASSR basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA.

En cuanto a la diferenciación genética, los resultados obtenidos respecto a la D_G, se muestra en las Tablas 34 y 35, donde se observa la clara diferencia entre los clones obtenidos mediante organogénesis indirecta de ambas especies de *Agave*. No existieron agrupamientos entre los clones obtenidos mediante OD y cuya D_G de Nei (1972) fue de 0.0, presentando fidelidad genética en los regenerantes. Lo

anterior concuerda con lo encontrado por González (2016) en *Cinchona officinalis L.*, utilizando marcadores tipo SSR así como los mismos RCV (BA y 2,4-D) para la inducción de OD e indirecta.

Tabla 34. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados por OD y OI del E2 de *Agave salmiana*, usando iniciadores RAPD y ASSR.

No. Clon	1OI	2OI	3OI	1OD	2OD	3OD
1OI	****					
2OI	0.3618	****				
3OI	0.4418	0.1335	****			
1OD	0.1752	0.4418	0.4700	****		
2OD	0.1752	0.4418	0.4700	0.0000	****	
3OD	0.1752	0.4418	0.4700	0.0000	0.0000	****

Tabla 35. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados por OD y OI del E2 de *Agave marmorata*, usando iniciadores RAPD y ASSR.

No. Clon	1OI	2OI	3OI	1OD	2OD	3OD
1OI	****					
2OI	0.0935	****				
3OI	0.3118	0.3872	****			
1OD	0.2642	0.2877	0.3365	****		
2OD	0.2642	0.2877	0.3365	0.0000	****	
3OD	0.2642	0.2878	0.3365	0.0000	0.0000	****

VI.4.2.3 Experimento 3

El primer Y24 y ASSR20 no amplificó bandas polimórficas en As, mientras que el primer Y41 y ASSR29 se observó un 50 y 80 % de polimorfismo, respectivamente en la especie mencionada.

En los marcadores RAPD no se encontró polimorfismo en Am, sin embargo, ambos marcadores ASSR si amplificaron bandas polimórficas en esta especie. Lo anterior

corrobora lo que varios autores recomiendan, que al usar marcadores moleculares, deben combinarse al menos dos metodologías para la corroboración exacta y así evitar falsos positivos (Chen *et al*., 1998; Ooms *et al*.,1987).

El tamaño de las bandas para ambas especies se observó en un intervalo de 200-1500 pb con los marcadores RAPD, mientras que en los ASSR fue de 200-1750 pb.

Se observaron dos bandas específicas en As, una con el primer Y41 con un peso de 1250 pb y la segunda con el primer ASSR29 de 450 pb, en Am se encontró una banda específica con el primer ASSR20 con un peso de 200 pb.

Las características de los fragmentos amplificados de ADN con ambos tipos de marcadores moleculares se encuentran en la Tabla 36 y 37.

Tabla 36. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud en plántulas regeneradas por OD y OI de *Agave salmiana* del E3.

Primer	Bandas totales	Bandas monomórficas	Bandas específicas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo	Tamaño (pb)
Y24	4	4	0	0	0	400-500
Y41	10	5	1	5	50	200-1500
Promedio	7	4.5	0.5	2.5	25	650
Total	14	9	1	5	-	-
ASSR20	4	4	0	0	0	300-500
ASSR29	10	2	1	8	80	450-1750
Promedio	7	3	0.5	4	40	750
Total	14	6	1	8	-	-

Tabla 37. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases de longitud en plántulas regeneradas por OD y OI de *Agave marmorata* del E3.

Iniciador	Bandas totales	Bandas monomórficas	Bandas específicas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo	Tamaño (pb)
Y24	4	4	0	0	0	400-500
Y41	6	6	0	0	0	300-800
Promedio	5	5	0	0	0	500
Total	10	10	0	0	-	-
ASSR20	11	4	1	7	63.64	200-1500
ASSR29	6	4	0	2	33.33	650-1000
Promedio	8.5	4	0.5	4.5	48.49	837.5
Total	17	8	1	9	-	-

En la Figura 22 se muestran los dendrogramas obtenidos a partir de la distancia genética de Nei (1972) (Tabla 39 y 40). En el caso de As se formaron dos grandes grupos y en la especie Am se observaron tres grupos, lo que comprueba la existencia de variaciones dentro de los clones, a pesar de ello se debe mencionar que los individuos que no pasaron por una etapa de callo no presentaron bandas polimórficas, por lo tanto tampoco se observó VS.

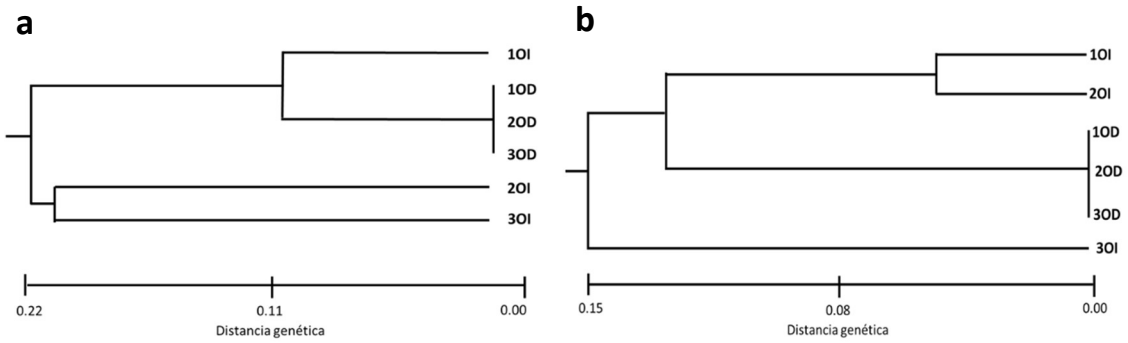

Figura 22. Dendrograma mostrando el agrupamiento de seis clones de *A. salmiana* (a) y *A. marmorata* (b), respectivamente en el E3 obtenidos a partir del análisis con iniciadores RAPD y ASSR basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA.

El cultivo de meristemos que no pasa por un estado de desdiferenciación puede producir o no variación comparada con aquellos explantes que si lo hagan (Bayliss, 1977; D'Amato, 1985; Karp y Bright, 1985).

Tabla 38. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados por OD y OI en el E3 de *Agave salmiana*, usando iniciadores RAPD y ASSR.

No. Clon	1OI	2OI	3OI	1OD	2OD	3OD
1OI	****					
2OI	0.0364	****				
3OI	0.1133	0.1542	****			
1OD	0.0741	0.1133	0.1133	****		
2OD	0.0741	0.1133	0.1133	0.0000	****	
3OD	0.0741	0.1133	0.1133	0.0000	0.0000	****

Tabla 39. Distancia genética de Nei (1972), entre los clones regenerados por OD y OI en el E3 de *Agave marmorata,* usando iniciadores RAPD y ASSR.

No. Clon	1OI	2OI	3OI	1OD	2OD	3OD
1OI	****					
2OI	0.1542	****				
3OI	0.1967	0.1967	****			
1OD	0.0935	0.2187	0.2187	****		
2OD	0.0935	0.2187	0.2187	0.0000	****	
3OD	0.0935	0.2187	0.2187	0.0000	0.0000	****

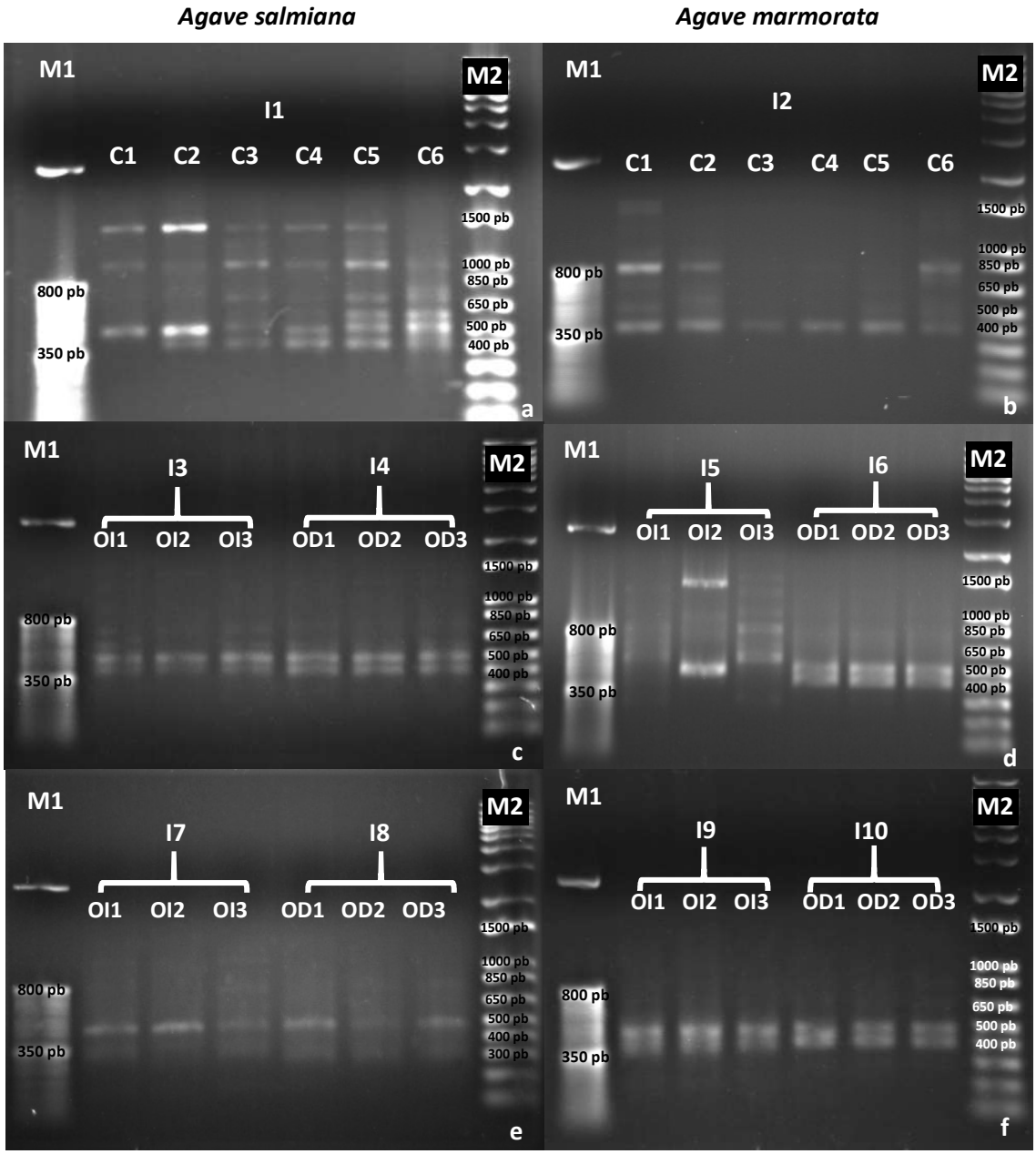

Figura 23. Productos de amplificación de PCR utilizando el marcador Y24 RAPD con 10 bases en plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* del experimento E1, E2 y E3. pb= pares de bases, M1= marcadores escalera de bajo rango (2,500 pb), M2= marcador escalera de alto rango (15,000 pb). a y b: fragmentos amplificados en plántulas del E1 de As y Am, respectivamente, c y d= fragmentos amplificados en plántulas del E2 de As *y* Am, respectivamente, e y f= fragmentos amplificados en plántulas de E3 de As y Am, respectivamente.

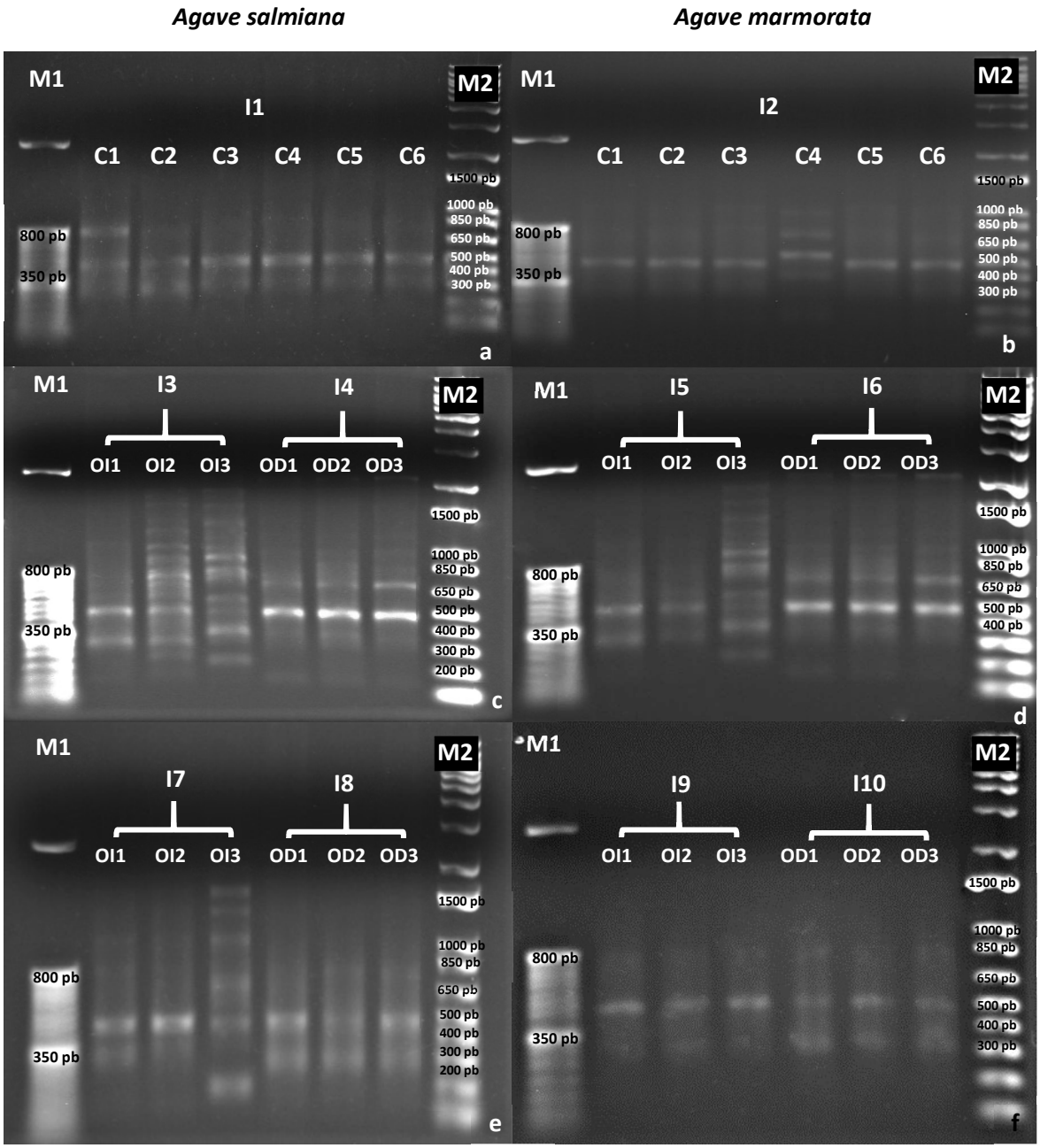

Figura 24. Productos de amplificación de PCR utilizando el marcador Y41 RAPD con 10 bases en plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* del experimento E1, E2 y E3. pb= pares de bases, M1= marcadores escalera de bajo rango (2,500 pb), M2= marcador escalera de alto rango (15,000 pb). a y b: fragmentos amplificados en plántulas del E1 de As y Am, respectivamente, c y d= fragmentos amplificados en plántulas del E2 de As *y* Am, respectivamente, e y f= fragmentos amplificados en plántulas de E3 de As y Am, respectivamente.

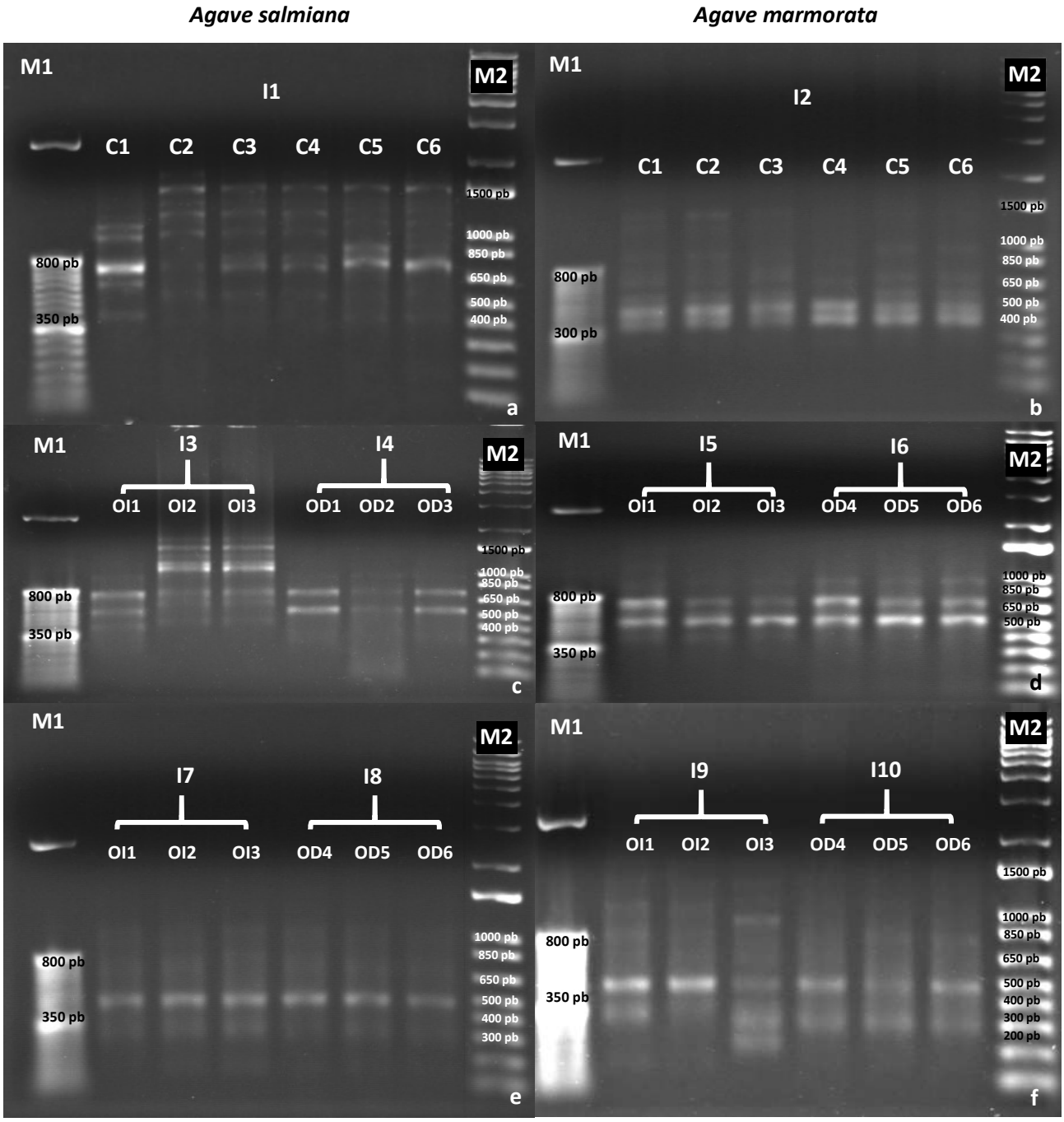

Figura 25. Productos de amplificación de PCR utilizando el marcador ASSR20 con 10 bases en plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* del experimento E1, E2 y E3. pb= pares de bases, M1= marcadores escalera de bajo rango (2,500 pb), M2= marcador escalera de alto rango (15,000 pb). a y b: fragmentos amplificados en plántulas del E1 de As y Am, respectivamente, c y d= fragmentos amplificados en plántulas del E2 de As *y* Am, respectivamente, e y f= fragmentos amplificados en plántulas de E3 de As y Am, respectivamente.

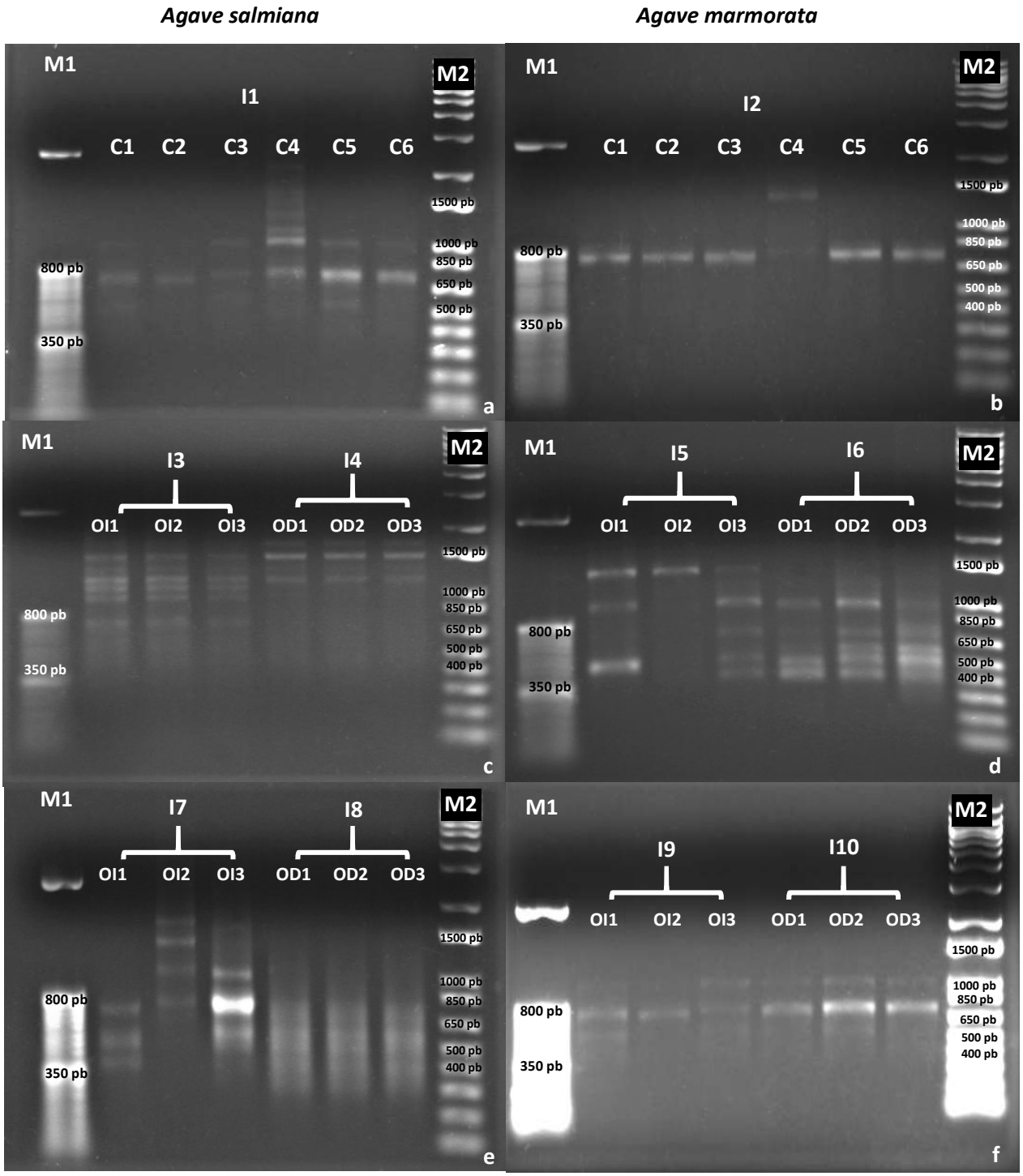

Figura 26. Productos de amplificación de PCR utilizando el marcador ASSR29 con 10 bases en plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* del experimento E1, E2 y E3. pb= pares de bases, M1= marcadores escalera de bajo rango (2,500 pb), M2= marcador escalera de alto rango (15,000 pb). a y b: fragmentos amplificados en plántulas del E1 de As y Am, respectivamente, c y d= fragmentos amplificados en plántulas del E2 de As *y* Am, respectivamente, e y f= fragmentos amplificados en plántulas de E3 de As y Am, respectivamente.

VI.4.2.4 Marcadores RAPD

Los patrones de bandeo generados por los iniciadores RAPD (Figura 23, 24, 25 y 26) se muestran en la Figura 27, donde se puede observar la matriz binaria obtenida de cada experimento.

Figura 27. Matriz binaria mostrando el polimorfismo generado con dos primers tipo RAPD de diez bases para el análisis de la variación somaclonal en plántulas regeneradas en *A. salmiana* y *A. marmorata* provenientes del experimento E1, E2 y E3. Los recuadros amarillos corresponden a bandas únicas. Los recuadros rojos son las bandas comunes. El recuadro azul indica el nombre del primer utilizado.

E1AS

Y24	I1	I2	I3	I4	I5	I6
1500	1	1	1	1	1	0
1250	0	0	1	0	0	0
1000	1	1	1	1	1	1
650	0	0	1	1	1	1
575	0	0	0	0	1	1
500	1	1	1	1	1	1
400	0	1	1	1	1	1

E1AM

Y24	I1	I2	I3	I4	I5	I6
1500	1	0	0	0	0	1
850	1	1	0	0	0	1
650	1	1	0	0	0	1
500	1	1	0	0	1	1
400	1	1	1	1	1	1

E1AS

Y41	I1	I2	I3	I4	I5	I6
800	1	1	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1

E1AM

Y41	I1	I2	I3	I4	I5	I6
1000	0	0	1	1	1	1
650	0	0	0	1	0	0
575	0	0	0	1	0	0
500	1	1	1	0	1	1
400	0	0	0	1	0	0

E2AS

Y24	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
500	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1

E2AM

Y24	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1500	0	1	1	0	0	0
1250	0	0	1	0	0	0
1000	0	0	1	0	0	0
850	1	1	1	0	0	0
650	1	0	1	0	0	0
500	0	1	0	1	1	1
400	0	0	0	1	1	1

E2AS

Y41	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
2500	0	1	1	1	1	1
2000	0	1	1	0	0	0
1750	0	1	1	0	0	0
1500	0	1	1	0	0	0
1000	0	1	1	1	1	1
850	0	1	1	0	0	0
800	0	1	0	1	1	1
650	0	1	0	0	0	0
575	0	1	1	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1
400	0	0	1	0	0	0
350	1	1	0	0	0	0
300	0	0	1	0	0	0

E2AM

Y41	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
2500	0	0	1	1	1	1
2000	0	0	1	0	0	0
1500	0	0	1	0	0	0
1000	0	0	1	1	1	1
850	0	0	1	0	0	0
800	0	0	0	1	1	1
650	0	0	0	0	0	0
575	0	0	1	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1
400	0	0	1	0	0	0
350	1	1	0	0	0	0
200	0	1	0	0	0	0

E3AS

Y24	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
500	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1

E3AM

Y24	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
500	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1

E3AS

Y41	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1500	0	0	1	0	0	0
1250	0	0	1	0	0	0
1000	1	1	1	0	0	0
800	0	0	0	1	1	1
650	0	0	1	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1
350	1	1	0	0	0	0
300	0	0	0	1	1	1
200	0	0	1	0	0	0

E3AM

Y41	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
800	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1	1

VI.4.2.5 Marcadores ASSR

Los patrones de bandeo generados por los iniciadores ASSR (Figura 23, 24, 25 y 26) se muestran en la Figura 28, donde se puede observar la matriz binaria obtenida de cada experimento.

Figura 28. Matriz binaria mostrando el polimorfismo generado con dos primers tipo ASSR de diez bases para el análisis de la variación somaclonal en plántulas regeneradas en *A. salmiana* y *A. marmorata* provenientes del experimento E1, E2 y E3. Los recuadros rojos son las bandas comunes. El recuadro azul indica el nombre del primer utilizado.

E1AS

ASSR20	I1	I2	I3	I4	I5	I6
2000	0	0	0	0	0	0
1750	0	1	0	0	0	0
1500	0	1	1	1	1	1
1375	0	1	0	0	0	0
1250	0	1	1	1	0	0
1125	1	0	0	0	0	0
1000	0	1	1	1	0	0
925	1	0	0	0	0	0
850	0	0	0	0	1	0
800	0	0	1	1	0	0
700	1	1	1	1	1	1
650	1	0	0	0	0	0
500	1	1	1	0	0	0
400	1	0	0	0	1	1

E1AM

ASSR20	I1	I2	I3	I4	I5	I6
1500	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	0	0	1	1
850	1	1	0	1	0	0
650	1	1	1	1	1	1
575	1	1	1	0	1	1
500	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1

E1AS

ASSR29	I1	I2	I3	I4	I5	I6
2000	0	0	0	1	0	0
1750	0	0	0	1	0	0
1500	0	0	0	1	0	0
1334	0	0	0	1	0	0
1167	0	0	0	1	0	0
1000	1	0	1	1	1	1
800	0	0	1	1	1	1
700	1	1	0	0	0	0
500	1	0	0	0	1	0

E1AM

ASSR29	I1	I2	I3	I4	I5	I6
1500	0	0	0	1	0	0
800	1	1	1	1	1	1

E2AS

ASSR20	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1750	0	1	1	0	0	0
1500	0	1	1	0	0	0
1375	0	1	1	0	0	0
1250	0	1	1	0	0	0
1125	0	1	1	0	0	0
1000	1	0	0	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1
650	0	1	1	0	0	0
575	1	0	0	1	1	1
500	0	1	1	0	0	0
400	1	0	0	0	0	0

E2AM

ASSR20	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1000	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	0	0	0

E2AS

ASSR29	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1750	0	0	0	1	1	1
1500	1	1	1	1	1	1
1375	1	1	1	1	1	1
1250	1	1	1	1	1	1
1125	1	1	1	0	0	0
1000	1	1	1	0	0	0
800	1	1	1	0	0	0

E2AM

ASSR29	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1500	1	1	1	1	1	1
1250	0	0	1	0	0	0
1000	1	0	1	1	1	1
700	0	0	1	1	1	1
650	0	0	0	0	0	0
575	0	0	0	1	1	1
500	0	0	1	1	1	1
400	0	0	1	1	1	1

ASSR20	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
500	1	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1	1

ASSR20	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1500	1	1	1	0	0	0
1250	1	1	0	0	0	0
1000	0	0	1	0	0	0
850	1	1	0	0	0	0
650	0	0	1	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	0	0	0
300	0	0	1	1	1	1
200	0	0	1	0	0	0

ASSR29	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1750	0	1	0	0	0	0
1500	0	0	1	0	0	0
1250	0	1	0	0	0	0
1000	0	1	1	0	0	0
850	0	1	1	0	0	0
800	1	0	0	1	1	1
650	0	0	0	0	0	0
575	1	0	1	1	1	1
500	0	0	0	0	0	0
450	1	0	0	0	0	0

ASSR29	OI1	OI2	OI3	OD1	OD2	OD3
1000	1	0	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1
650	1	0	0	1	1	1

VI.5 Variación somaclonal

A pesar de la pequeña población estudiada de cada experimento, la variabilidad en la respuesta de los materiales evaluados provenientes de organogénesis indirecta fue evidente. En ambas especies se encontraron bandas polimórficas que se evidenciaron en los dendrogramas arrojados por la D_G de Nei (1972), usando el método UPGMA.

Aunque se obtuvieron resultados eficientes con el sistema de organogénesis indirecta, mediante el análisis genético con ambos tipos de marcadores moleculares se encontró inestabilidad en todos los clones que pasaron por una fase de tejido calloso en los tres experimentos, concordando con lo obtenido en otras especies propagadas vía organogénesis indirecta (González, 2016; Oliveira *et al.*, 1995), esto se puede deber a la heterogeneidad de las células de callo y a la acumulación de alteraciones genómicas (Kuznetsova *et al*., 2006) durante el cultivo a largo plazo (Bublyk *et al*., 2012). Las partes no meristemáticas y los estados intermedios de callo tienen un alto riesgo de inestabilidad genética entre las plantas regeneradas (Martınez-Palacios *et al*., 2003).

El factor común en los explantes que atravesaron por OI es considerado el 2,4-D, el cual se ha asociado a anormalidades genéticas, mutaciones (Ladyzynski *et al*., 2002: Kunakh, 2005; Mohanty *et al.,* 2008) y la metilación del ADN que produce cambios en el fenotipo (Chakrabarty *et al*., 2003; Regalado *et al*., 2015). Lo anterior ha sido reportado en especies como *Cinchona officinalis L.* (González, 2016), *Aloe*

Vera (Rathore *et al*., 2011), *Annanas comosus* (Soneji *et al*., 2002), y Bletilla striada (Wang y Tian, 2014). Cabe destacar que los explantes que pasaron por una fase de callo utilizados para el análisis de la VS en esta investigación fueron obtenidos de un segundo subcultivo en el medio de inducción de callo. Davi *et al*. (2014) mencionan que cuanto mayor es el número de subcultivos mayor es el riesgo de variaciones genéticas, esto puede ser a causa del aumento en la duración a la exposición a factores a causa de estrés, tales como los RCV. En varios estudios se indica que las mutaciones se acumulan secuencialmente con el tiempo del cultivo, las plantas regeneradas a partir de tres meses de cultivo pueden contener un número pequeño de mutaciones y luego de varios subcultivos ocurrir la acumulación de mutaciones (González, 2016; Kaeppler *et al*., 2000; Zhang, y Zhang, 2015).

Por lo antes mencionado, este método no es recomendable para la obtención de plantas que conserven las características genéticas originales de la especie, pero sí puede ser interesante para la generación de variantes con valor agronómico u ornamental (Domínguez-Rosales *et al*., 2008), ya que la variabilidad genética provee oportunidades de estudiar cuestiones relacionadas con la calidad de las plantas (contenido de carbohidratos, periodo de maduración y resistencia a enfermedades) (Valenzuela-Sánchez *et al*, 2006).

En el estudio de la variación genética utilizando RAPD se han reportado varios casos, tal como en plántulas regeneradas vía pseudobulbos de *Bletia purpurea* Lam. (Yah-Chulim, 2011), donde no encontraron alteraciones genéticas utilizando AIA y

BA como RCV para la proliferación de brotes vía OD, de igual manera González, (2016) no encontró VS en la brotación directa mediante combinaciones de BA/NAA de la cactácea *Cinchona officinalis* L. utilizando marcadores SSR. Lo anterior concuerda con lo obtenido en este trabajo de investigación, de acuerdo a los patrones de bandeo obtenidos con los marcadores RAPD y ASSR no se encontró VS en los brotes obtenidos mediante organogénesis directa de ambas especies estudiadas, comprobando lo mencionado por Peschke y Phillips (1992), la organogénesis directa utilizando la zona meristemática está asociada con una alta estabilidad genética.

Esta investigación difiere con lo reportado por González e Infante (2000), quienes no detectaron variabilidad genética utilizando 2,4.D para inducir embriogénesis somática en henequén (*A. fourcroydes* Lem.), En *Agave tequilana* Weber var Azul Díaz-Martínez *et al*. (2012) no encontraron VS entre los clones obtenidos y la planta madre utilizando marcadores tipo AFLP.

Diferencias en la estabilidad de los cultivos de tejidos producidos a partir de diferentes explantes a menudo pueden deberse a la variabilidad preexistente en ellos. El caso más ampliamente reconocido de este hecho es la polimatía (en donde las células diploides y poliploides coexisten en el mismo tejido); esta condición se puede encontrar en más del 90% de las especies de plantas (D'Amato, 1952, 1985). Van den Bulk *et al*.(1990) demostraron que el hipocótilo es polisomático mientras que otros explantes como hoja y cotiledón mostraron poco o ninguna célula diploide. Lo anterior explica el porcentaje de polimorfismo encontrado en los experimentos,

ya que en las plántulas evaluadas del E1 en el cual se empleó como explante el embrión cigótico de semilla con ambos primers se encontró la mayor variación genética. Además que esto puede contribuir en general a la variación encontrada en los tres experimentos en ambas especies, ya que todos los explantes utilizados provenían de semilla. Sin embargo, los tres explantes utilizados mantuvieron su capacidad de respuesta morfogénica así como su estabilidad genética en la regeneración de brotación vía directa, por lo que no es un factor determinante en la VS por esta vía de propagación.

En base a lo anterior podemos concluir que se encontró VS en los clones provenientes de una etapa de callo y de un medio adicionado con 2,4-D, no así en los individuos obtenidos mediante organogénesis directa, lo que sugiere que la adición de BA no influye en la variabilidad genética a pesar de las altas concentraciones utilizadas en este trabajo.

El presente estudio es el primero realizado sobre la estabilidad genética de los brotes regenerados en el cultivo *in vitro* de *Agave salmiana* y *Agave marmorata* mediante brotación directa y regeneración indirecta.

VII. CONCLUSIONES

- El mejor tratamiento para la inducción de callogénesis fue el T2 (1.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 15 mg L^{-1} de BA) para *Agave salmiana* y el T4 (5 mg L^{-1} de 2,4-D y 3 mg L^{-1} de BA) para *Agave marmorata*.
- El mayor peso se obtuvo en el E3 cuando se usó la ZM de plantas de 6 meses cultivadas *ex vitro*.
- El mejor tratamiento para la regeneración de brotes fue el T4 (5.0 mg L^{-1} BA) en *Agave marmorata,* y el T5 (10.0 mg L^{-1} BA) en *Agave salmiana*.
- En *Agave salmiana* el mayor número de brotes se obtuvo empleando la ZM de plántulas *in vitro* mediante la regeneración directa siendo de 23.8 brotes/explante, en *Agave marmorata* el mayor número se observó al utilizar el embrión cigótico pasando por una etapa de organogénesis indirecta obteniendo 26.7 brotes/explante.
- Utilizando primers tipo RAPD y ASSR la fidelidad genética se mantuvo en los sistemas de propagación directa. Por su parte los tratamientos con presencia de 2,4-D, que atravesaron consecuentemente por una fase de callo presentaron variación genética.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, J. M. J. (2010). *Análisis de la formación de bulbilos en Agave tequilana a nivel histológico y molecular* (Instituto Politecnico Nacional). Retrieved from http://www.ira.cinvestav.mx:86/tesis/abraham_2010.pdf

Abreu, E, González, G., Ortiz, R., Rodríguez, P., Domech, R., & Garriga, M. (2007). Evaluación de vitroplantas de Henequen (*Agave fourcroydes* Lem) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales*, *28*(1), 5–11.

Abreu, Enildo, Sosa, M., Ascunce, G., & González, G. (2016). Efecto de antibióticos en la propagación in vitro de *Agave fourcroydes* Lem. *Universidad De Matanzas*, *16*(1), 31–36.

Adn40, R. (2017). Pulque mexicano: una de las bebidas más codiciadas en el mundo. Retrieved from adn40 website: https://www.adn40.mx/noticia/cultura/nota/2017-05-04-15-58/pulque-mexicano--una-de-las-bebidas-mas-codiciadas-en-el-mundo/

AGARED. (2017). Panorama del aprovechamiento de los agaves en Mexico. In *Panorama del aprovechamiento de los agaves en México* (p. 300).

Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, *27*(4), 617–631. https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z

Aguilar Jiménez, D., & Rodríguez De la O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *20*(2), 124–131. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084

Aguilar Juárez, B., Enríquez Del Valle, R., Rodríguez-Ortiz, G., Granados Sánchez, D., & Cerero, B. M. (2014). El estado actual de *Agave salmiana* y *A. mapisaga* del Valle de México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, *2*(1), 2007–9559.

Aguirre-Dugua, X., & Eguiarte, L. E. (2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*, *90*, 36–44. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018

Ahloowalia, B. S. (1998). In-vitro Techniques and Mutagenesis for the Improvement of Vegetatively Propagated Plants. *Joint FAO/IAEA Division, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria*, 293–309.

Ahloowalia, B. S., & Sherington, J. (1985). Transmission of somaclonal variation in wheat. *Euphytica*, *34*(2), 525–537. https://doi.org/10.1007/BF00022950

Al-Zahim, M. A., Ford-Lloyd, B. V., & Newbury, H. J. (1999). Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant*

Cell Reports, *18*(6), 473–477. https://doi.org/10.1007/s002990050606

Alfonso-León, C. (2014). El maguey y sus partes. *Arqueología Mexicana*, 56.

Alizadeh, M., & Kumar, S. (2009). Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. *Iranian Jurnal of Biotechnology*, *7*(3), 151–158.

Alonso, G. M. (2002). *Biotecnología aplicada a la mejora de Pelargonium.* Universidad Complutense de Madrid.

Álvarez-Duarte, M. del C., Garcia-Moya, E., Suarez-Espinosa, J., Luna-Cavazos, M., & Rodríguez-Acosta, M. (2018). Conocimiento Tradicional, Cultivo Y Aprovechamiento Del Maguey Pulquero En Municipios De Puebla Y Tlaxcala. *Polibotánica*, *0*(45), 205–222. https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.15

Álvarez de Zayas, A. (1989). Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceas. *La Habana, Cuba. Revista Del Jardín Botánico Nacional.*, *10*(3), 25–36.

Álvaro Bernal-Flores, Adrián R. Quero-Carrillo*, A. R.-P., & Pérez-Rodríguez, H. A. Z.-M. y P. (2015). Eembriogénesis somática inducida con estres en *Bouteloua curtipendula* (Michx .) Torr ., especie recalcitrante y apomíctica. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *38*(4), 359–367.

Anu, A., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2004). Variations Among Somaclones and its Seedling Progeny in *Capsicum Annuum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *76*(3), 261–267. https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000009246.24216.ea

Aravanopoulos, F. (2003). Molecular identification of micropropagated plants. *Acta Horticulturae*, *616*, 25–47.

Arreola, E. Y., Ángeles, G. V. C., Raymundo, J., & Velasco, V. A. V. (2016). Aclimatación de *Agave americana* var . Oaxacensis obtenidas in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *7*(4), 911–922.

Arzate-Fernández, AM., Nakazaki, T., Okumoto, Y. (1997). Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb .). *Plant Cell Reports*, *16*, 836–840. Retrieved from https://doi.org/10.1007/s002990050330

Arzate-Fernández, Amaury-Martín, & Mejía-Franco, R. (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embriones cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *34*(2), 101–106. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802011000200008&lng=es&tlng=es

Avila, J. T., de Vera, A. M., Hernández, C., & Vasallo, P. M. (1993). Análisis del DNA. II: Cloanr, secuenciar y PCR. *Biología Molecular En Nefrología*, *XIII*(4).

Bairu, M., Fennell, C., & van Staden, J. (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Scientia*

Horticulturae, *108*, 347–351. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.039

Bajaj, Y. P. S. (1991). Biotechnology in Agriculture and Forestry 17 High-Tech and Micropropagation I. In *Springer-Verlag*. Berlin Heidelberg New York.

Balch, E. P. M., Esparza Araiza, M. J., & Pérez Reyes, M. E. (2012). Conservación in vitro de germoplasma de *Agave* spp. Bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *35*(4), 279–287.

Bardakci, F. (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkush Journal of Biology*, *25*, 185–196. Retrieved from http://www.ipmd.ir/Papers/Random Amplified Polymorphic.pdf

Bayliss, M. W. (1977). The effects of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of *Duucus carota*. *Plant Science*, *8*, 99–103.

Bellec, Y., Bellini, C., & Faure, J. (2003). *Hormonal Control of Cell Proliferation Requires*. *132*(July), 1217–1227. https://doi.org/10.1104/pp.102.019026.AHP2

Berkelman, T., Willson, T. and S. T. (1998). *Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles & methods.* Amersham Pharmacia Biotech.

Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T. K., Thang, T. D., & Phong, D. T. (1990). Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *23*(1), 67–70. https://doi.org/10.1007/BF00116091

Bray, D. S., & Jain, S. M. (1998). Somaclonal Variation: Mechanism and Applications in Crop Improvement. In S. M. Jain, D. S. Brar, & B. S. Ahloowalia (Eds.), *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement* (pp. 15–37). https://doi.org/10.1007/978-94-015-9125-6_2

Bublyk, O., Andreev, I., V, S., & Kunakh, V. (2012). Genetic variability in regenerated plants of *Ungernia victoris*. *Biologia Plantarum*, *56*, 395–400. https://doi.org/10.1007/s10535-012-0106-2

Calva C. G., R. L. E. (1999). Aspectos aplicados de la biotecnología. In *Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios* (pp. 267–301).

Caraballo, M. G., Oramas, G. G., García, S. A., & Cruz, E. A. (2010). Manejo de la Interacción Auxina-Citoquinina para mejorar el protocolo de micropropagación de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem .). *Chilean Journal of Agricultural Research*, (May 2017).

Carballo, M. G., Oramas, G. G., García, S. A., Cruz, E. A., Bravo, K. Q., Caligari, P. D. S., & García-gonzález, R. (2010). Management of auxin.cytokynin interactions to improve micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem .). *Chilean Journal of Agricultural Research*, *70*(4), 545–551.

Castro-Concha, L., Loyola-Vargas, V. M., Chan, J. L., & Robert, M. L. (1990). Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *22*(2), 147–151. https://doi.org/10.1007/BF00043690

Ch, C., & Gonz, J. C. (2016). *Revisión del agave y el mezcal Review of agave and mezcal*. *XVIII*(1). https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552

Chen, W., Chen, T., Fu, Y. M., Hsieh, R., & Chen, W. (1998). Studies on somaclonal variation in Phalaenopsis. *Plant Cell Rep.*, *18*, 7–13. https://doi.org/10.1007/s002990050523

Condemarín M. C. E., C. R. J. y V. A. C. (2007). Efecto del acido indolbutirico (iba) y 6 bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo *in vitro* de yemas axilares de Encyclia microtos (RCHB.F.) hoehne (Orchidaceae). *Lankesteriana*, *7*(1–2), 247–254.

CRM. (2015). Mezcal.com.

D'Amato, F. (1952). Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. *Caryologia*, *4*, 311–358.

D'Amato, F. (1985). Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *Plant Science*, *3*, 73–112.

Daniel Guillot Ortiz, Piet Van der Meer, E. L. L. & J., & Picornell, A. R. (2009). *El género Agave L. en la flora alóctona valenciana*.

Das, T. (1992). Micropropagation of *Agave sisalan*a. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *31*(3), 253–255. https://doi.org/10.1007/BF00036233

De-la-Peña, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J. L., López-Torres, A., Wrobel, K., & Robert-Díaz, M. L. (2012). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biology*, *12*(May 2014). https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-203

De Robertis, E. M. (2006). Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(4), 296–302. https://doi.org/10.1038/nrm1855

De Robertis, J. (2006). Biología Celular y Molecular. In *Ciencias de la Salud, Naturales y Divulgación Científica* (15th ed., p. 486). El Ateneo.

Díaz-Martínez, M., Nava-Cedillo, A., Guzmán-López, J. A., Escobar-Guzmán, R., & Simpson, J. (2012). Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science*, *185–186*, 321–330. https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2012.01.004

Domínguez-Rosales, M. S., Alpuche-Solís, Á. G., Vasco-Méndez, N. L., & Molphe-Balch, E. P. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de Agaves Mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *31*(4), 317–322.

Domínguez Rosales, M. S., González Jiménez, M. D. L. L., Gómez Rosales, C., Valles Quiñones, C., Delgadillo Días de León, S., Mireles Ordaz, S. J., & Pérez Molphe Balch, E. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento , mejoramiento y conservación de especies del género

Agave. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, *41*, 53–62.

E., S. J. (1980). Laboratory culture. In *Plant tissue culture as a source of biochemicals.* (pp. 1–20). Boca Raton, Florida, U.S.A.

Eisenstein, B. I. (1990). The polimerasa chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med*, *18*, 178–183.

Elisama, M., Luna, M., Raymundo Enríquez-Del Valle, J., Arturo, V., Velasco, V., Villegas Aparicio, Y., … Rodríguez Ortíz, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de Agave. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *6*, 1151–1159. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4nspe6/v4spe6a7.pdf

Elizabeth, M. C. R., Guzmán, E., De, D., Dra, T., & Simpson, J. (2009). Estudio de la biología reproductiva y análisis molecular de la reproducción sexual y asexual de *Agave tequilana Weber var . azul Biotecnología de Plantas*.

Enrech, N. (1999). *Una década de aplicación del método RAPD: alcances y limites en el estudio de relaciones genéticas en plantas*. *51*.

Enríquez del Valle, José Raymundo; Carrillo Castañeda, Guillermo; Rodríguez de la O, J. L. (2005). Sales inorgánicos y ácido indolbutirico en el enraizado *in vitro de Agave angustifolia*. *28*, 175–178.

Erlwein, S., Mira Tapia, R. J., & Velasco Pegueros, A. (2013). Proceso de elaboración del pulque, su importancia económica y concepción social en Apan, Hidalgo. In *In Ejercicios etnográficos, aprendiendo a investigar*.

Fang JY, H. Y. (2012). Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micro propagated Aglaonema cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *110*, 53–62.

Fernández, M., Figueras, A., & Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical Applied Genetics*, *5*(104), 845–851.

Flores-Benítez, S., Jiménez-Bremont, J. F., Rosales-Mendoza, S., Argüello-Astorga, G. R., Castillo-Collazo, R., & Alpuche-Solís, Á. G. (2007). Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *91*(3), 215–224. https://doi.org/10.1007/s11240-007-9287-3

Flores-Maya, S., Vargas-Jurado, M. Á., Suárez-Mota, M. E., & Barrera-Escorcia, H. (2015). Análisis cariotípico de *Agave marmorata* y *A. peacockii* (Agavaceae) ubicados en las terrazas aluviales del río Zapotitlán, Puebla, México. *Polibotánica*, *0*(40). https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.7

Fujii, J. A. A., Slade, D., Olsen, R., Ruzin, S. E., & Redenbaugh, K. (1990). Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Science*, *72*(1), 93–

100. https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90190-Y

Gabriel, J. (2017). *Contribuciones de la UNESUM a la Biotecnología de plantas*. (April).

García, C. (2017). *Los Agaves y el campo Mexicano*. (18), 32.

García Valenzuela, M. A. (2011). Etnoecología de los Agaves (Agavaceae) en la comunidad Ngiwa (Popoloca) de los Reyes Metzontla, Puebla. Colegio de Postgraduados.

George, E. f. (1993). *Plant propagation by tissue culture. The thecnology* (Exegetics, Ed.). England.

Gibbs, R. A. (1990). DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem*, *62*, 1202–1214.

Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedillo, A., & Simpson, J. (2006). AFLP analysis of Agave tequilana varieties. *Plant Science*, *170*(4), 904–909. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014

Godwin, I. D., Sangduen, N., Kunanuvatchaidach, R., Piperidis, G., & Adkins, S. W. (1997). RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (Oryza sativa var.indica) somaclonal progenies. *Plant Cell Reports*, *16*(5), 320–324. https://doi.org/10.1007/BF01088289

González, G., Alemán, S., & Infante, D. (2000). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: Selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Sciences*, *165*, 595/601. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00227-9

González, G., Alemán, S., Trujilo, R., Keb, M., Abreu, E., Barredo, F., … Cornides, M. T. (2004). El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (Agave fourcroydes). *Biotecnología Aplicada*, *21*(1), 44–48.

González, R. A. (2016). Conservación de plantas regeneradas in vitro y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis, Linneo.* Universidad politecnica de Madrid.

Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S., & Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(24), 9124–9129. https://doi.org/10.1073/pnas.0603312103

Groenewald. (1975). Callus Formation and Plant Regeneration From Seed Tissue of Aloe pretoriensis Pole Evans. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, *75*(3), 270–272. https://doi.org/10.1016/S0044-328X(75)80089-4

Groenewald. (1976). Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae). *Margarerha Mes Institute for Plant Physiology, University of Pretoria, South Africa*, *81*(4), 369–373. https://doi.org/10.1016/s0044-328x(77)80105-0

Guerrero, B. A. L. M. A. (2010). *Inducción de embriogénesis somática en cultivo in vitro de Agave atrovirens KARW. EX SALMDYCK*. Instituto Politécnico

Nacional.

Gutiérrez-Mora, A., Santacruz-Ruvalcaba, F., Cabrera, P., José, L., & Rodríguez-Garay, B. (2003). Mejoramiento genético vegetal in vitro. *E-Gnosis*, *1*, 0.

H., K., & J.A.D., Z. (1997). The five “Classical” Plant Hormones. *The Plant Cell*, *9*, 1197–1210.

Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L., & Hammerschlag, F. (1997). RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports*, *16*(9), 624–627. https://doi.org/10.1007/BF01275503

Hayden, M., & Sharp, P. (2001). Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. *Nucleic Acids Research*, *29*, E44-4. https://doi.org/10.1093/nar/29.8.e44

Hazra, S. K., Das, S., & Das, A. K. (2002). Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *70*(3), 235–240. https://doi.org/10.1023/A:1016517617039

Holden P. R., Aitken M., Lindsey K., Y. M. M. (1988). Variability and stability of cell cultures of Capsicum frutescens. In Y. M. M. Morris P., Scragg A., Stafford A. (Ed.), *Secondary metabolism in plant cell cultures* (pp. 237–243). England: Cambridge.

Hurtado, M. D. ., & Merino, M. M. . (1987). *Cultivo de tejidos vegetales* (Trillas, Ed.).

INEGI. (2019). *“Conociendo la industria del tequila y el mezcal.”*

Jacobs, T. (1997). Why Do Plant Cells Divide? *The Plant Cell*, *9*, 1021–1029.

Jaligot, E., Beule, T., Baurens, F.-C., Billotte, N., & Rival, A. (2004). Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the “mantled” variant phenotype in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.). *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil National de Recherches Canada*, *47*, 224–228. https://doi.org/10.1139/g03-085

Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F., & Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, *43*(2), 179–188. https://doi.org/10.1023/A:1006423110134

Karp, A., and Bright, S. W. J. (1985). On the causes and origins of somaclonal variation. *Plant Mol. Cell. Biol*, *2*, 199–234.

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, V., Ayad, W., and Hodgkin, T. (1997). *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies* (No. 2). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Kean-Galeno, & Tania. (2016). *Establecimiento de un banco de germoplasma de Agave spp.* Universidad Autonoma del Estado de México (UAEMex).

Kerstetter, R. A., & Hake, S. (1997). Shoot Meristem Formation in Vegetative Development. *The Plant Cell*, *9*, 1001–1010.

Krause, U., Thomson-Carter, F. M., & Pennington, T. H. (1996). Molecular epidemiology of Escherichia coli O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*(4), 959–961. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8815116

Kubis, S. E., Castilho, A. M. M. F., Vershinin, A. V, & Heslop-Harrison, J. S. (Pat). (2003). Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (Elaeis guineensis) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology*, *52*(1), 69–79. https://doi.org/10.1023/A:1023942309092

Kulus, D. (2014). Micropropagation of selected Agave species. *PhD Interdisciplinary Journal*, (December), 75–84. https://doi.org/10.13140/2.1.1482.6565

Kunert, K., Baaziz, M., & Cullis, C. (2017). Techniques for determination of true to type date palm (Phoenix dactylifera L.) plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *15*(1 SE-Regular Articles). https://doi.org/https://doi.org/10.9755/ejfa.v14i1.5277

Kuznetsova, O., Ash, O. A., & Gostimsky, S. A. (2006). The effect of the duration of callus culture on the accumulation of genetic alterations in pea Pisum sativum L. *Russian Journal of Genetics*, *42*, 555–562. https://doi.org/10.1134/S1022795406050139

L., Yépez. E., De Garcia. E., V. (2002). *Propagación in vitro de Agave cocui trelease.*

Lara, A. J. P. (2005). *Obtención de la huella genética de agaves mezcaleros de San Luis Potosí por RAPD y AFLP.* Instituto Potosino de investigación científica y tecnológica, A. C.

Larkin, P. (2004). Somaclonal Variation: Origins and Causes. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science by Marcel Dekker, Inc. All rights reserved.* (pp. 1158–1161).

Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, *60*(4), 197–214. https://doi.org/10.1007/BF02342540

Leifert C, W. W. (1992). Bacterial growth in plant tissue culture media. *Journal of Applied Bacteriology*, *72*, 460–466.

Lindsey K., Y. M. M. (1983). The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Exp. Bot*, *145*(34), 1055–1065.

Lopes, T., Pinto, G., Loureiro, J., Costa, A., & Santos, conceição. (2006). Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. *Tree Physiology*, *26*, 1145–1152. https://doi.org/10.1093/treephys/26.9.1145

M. Nei, W. H. L. (1972). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS U.S.A.*, *76*, 5269–5273.

MADDOCK, S., RISIOTT, R., PARMAR, S., Jones, M., & SHEWRY, P. (1985). Somaclonal Variation in the Gliadin Patterns of Grains of Regenerated Wheat Plants. *Journal of Experimental Botany - J EXP BOT*, *36*, 1976–1984. https://doi.org/10.1093/jxb/36.12.1976

Malda, B. G., & Luz, R. M. M. D. la. (2004). Comparación del comportamiento de magueyes pulqueros (Agave Salmiana Otto Ex. Salm y Agave mapisaga Trel) bajo esquemas de propagación in vitro y condiciones de invernadero. *Biología Scripta*, *1*, 1–6.

Martín, C., Uberhuaga, E., & Pérez, C. (2002). Application of RAPD markers in the characterisation of Chrysanthemum varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica*, *127*(2), 247–253. https://doi.org/10.1023/A:1020215016347

Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M., Chávez, V. M., & Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of Agave victoriae - reginae : *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *74*, 135–142. https://doi.org/10.1023/A:1023933123131

Martínez Ruiz, R., Azpíroz Rivero, H. S., Rodríguez De la O, J. L., Cetina Alcalá, V. M., & Gutiérrez Espinosa, M. A. (2005). Aclimatación de plantas obtenidas in vitro Eucalyptus urophylla S. T. BlakeEucalyptus grandis Hill Ex Maiden. *Ra Ximhai*, (March 2014), 591–600. https://doi.org/10.35197/rx.01.03.2005.09.rr

Martınez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., & Chávez, V. M. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of Agave victoriae - reginae : *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *74*, 135–142. https://doi.org/10.1023/A:1023933123131

Mendoza, A. J. G. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 14–23. Retrieved from https://www.redalyc.org/pdf/644/64408704.pdf

Mohan Jain, S. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, *118*(2), 153–166. https://doi.org/10.1023/A:1004124519479

Monja-Mio, K. M., Barredo, P. F., Herrera, H. G., Esqueda, V., & Robert, M. (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of Agave angustifolia Haw. 'Bacanora' plantlets during the in vitro to ex vitro transition process. *Scientia Horticulturae*, *189*(1), 32–40.

Monja-Mio, K. M., Quiroz-Moreno, A., Herrera-Herrera, G., Montero-Muñoz, J. L., Sánchez-Teyer, F., & Robert, M. L. (2018). Analysis of Two Clonal Lines (Embryogenic and Non-Embryogenic) of Agave fourcroydes Using AFLP and MSAP. *American Journal of Plant Sciences*, *09*(04), 745–762. https://doi.org/10.4236/ajps.2018.94059

Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2013). Variación morfológica y humanización de la Sección Salmianae del género Agave. *Agrociencia*, *91*(4), 375–398.

Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, *262*(4), 56–65.

Narváez Suárez, Alberto Ulises; Martínez Saldaña, Tomás; Jiménez Velázquez, M. (2016). El cultivo de maguey pulquero : opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agícola*, (56), 33–44. Retrieved from http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75749287005

Nava Becerril, R. M., & Arzate Fernández, A.-M. (2015). *Efecto de la combinación y concentración auxínica-citocinina en el proceso de embriogénesis somatica en Agave angustifolia Haw.* Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Navarro, W., & Perea, M. (1996). *Técnicas in vitro para la producción y mejoramiento de plantas* (2a EUNA; Heredia, Ed.). Costa Rica.

Nieto, R., Vargas, J., Rodríguez, A., & Jiménez, V. (2016). *El cultivo de maguey pulquero (Agave salmiana) en el valle del mezquital*.

Nikam, T. D., Bansude, G. M., & Aneesh Kumar, K. C. (2003). Somatic embryogenesis in sisal (Agave sisalana Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Reports*, *22*(3), 188–194. https://doi.org/10.1007/s00299-003-0675-9

Niubó E, Díaz P, Oliva O, Portieles R, Díaz A, A., & O, Rodríguez S, Soto A, S. C. (2004). Metodología para la obtención in vitro de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. *CENIC Ciencias Biológicas*, *35*(3), 55–161.

Nogales, L. (2017). Tepeztate, el maguey del monte. Retrieved from Mezcología website: https://mezcologia.mx/tepeztate/

Noro, Y., Takano-Shimizu, T., Syono, K., Kishima, Y., & Sano, Y. (2007). Genetic variations in rice in vitro cultures at the EPSPs--RPS20 region. *Theoretical and Applied Genetics*, *114*(4), 705–711. https://doi.org/10.1007/s00122-006-0470-4

Núñez-Palenius, H. G. y N. O.-A. (1999). In vitro mass cultivation of cells and tissues. In O. Paredes-López (Ed.), *Molecular Biotechnology for Plant Food Production* (pp. 89–130). Technomic Publishing Co. Inc. E.U.A.

Obledo-Vázquez EN, Flores-Verduzco N, C.-, & J, M. (2004). Detección del efecto de un extracto vegetal antimicrobiano sobre plantas de agave (Agave tequilana Weber var. azul) cultivadas in vitro utilizando fluorescencia inducida por láser (LIF). *Revista Mexicana de Fitopatología*, *22*(3), 328–332.

Oliveira S A, M F P S Machado, A. J. P. (1995). In vitro propagation of Cereus peruvianus Mill (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, *31*, 47–50.

Ooms, G., Burrell, M. M., Karp, A., Bevan, M., & Hille, J. (1987). Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed Agrobacterium. *Theoretical and Applied Genetics*, *73*(5), 744–750. https://doi.org/10.1007/BF00260785

Oriola, J. (1990). Metodología de la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Diag Biol*, *40*, 31–34.

Osuji, J., HARRISON, G., CROUCH, J., & Heslop-Harrison, P. (1997). Identification of the Genomic Constitution of Musa L. Lines (Bananas, Plantains and Hybrids) Using Molecular Cytogenetics. *Annals of Botany - ANN BOT*, *80*, 787–793. https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0516

Ot, V. (2013). La bebida de los dioses y su actualidad. *Colission*.

Palma, F. (2017). *Agaves mezcaleros de Oaxaca*. Retrieved from https://mezcologia.mx/tepeztate/

Palombi, M., & Damiano, C. (2002). Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (Actinidia deliciosa A. Chev). *Plant Cell Reports*, *20*(11), 1061–1066. https://doi.org/10.1007/s00299-001-0430-z

Parsons, J. R. & Darling, J. A. (2000). (2000). Maguey (Agave spp.) utilization in Mesoamerican civilization: a case for Precolumbian “pastoralism”. *Sociedad Botánica de México*, *66*, 81–91.

Pasqualone, A. (2013). *Cultivar identification and traceability, a molecular approach.*

Peng, X., Zhang, T., & Zhang, J. (2015). Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of Tetrastigma hemsleyanum callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *122*(1), 67–77. https://doi.org/10.1007/s11240-015-0750-2

Pérez, E., Ramírez, R., Gordon, H. y Ochoa, N. (1999). Introducción al cultivo in vitro de tejidos vegetales. *Universidad de Aguascalientes*, *Primera Ed*, 71–80.

Pérez Ponce, J. N. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.* Santa Clara,Cuba: Instituto de biotecnología de las plantas.

Peschke, V. M., & Phillips, R. L. (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*, *30*(C), 41–75. https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60318-1

Petiard V., B. F. A. (1985). El cultivo de células vegetales. *Mundo Científico*, *7*(71), 730–736.

PETIARD V., B. F. A. (1985). El cultivo de células vegetales. *Mundo Científico*, *71*(7), 730–736.

Picca, B., Helguera, M., Salomón, N., & Carrera, A. (2004). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* (INTA; G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski, Eds.). Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.

Pierik.RLM. (1997). *In vitro culture of higuer plants* (Dordrecht & Kluwer, Eds.).

Pierik, R. L. M. (1990). *Producción de plantas libres de enfermedades. En: Cultivo*

in vitro de las plantas superiores. (3rd ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa.

Powers, D. E., & Backhaus, R. a. (1989). *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *16*(1), 57–60. https://doi.org/10.1007/BF00044072

Prado, M. J., Gonzalez, M. V, Romo, S., & Herrera, M. T. (2007). Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *88*(1), 1–10. https://doi.org/10.1007/s11240-006-9116-0

Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A., & García-Lara, S. (2015). Micropropagation of Agave salmiana: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles. *Frontiers in Plant Science*, *6*. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01026

Pulques. (2014). *PROPAGACIÓN IN VITRO Y EX VITRO DE AGAVE SALMIANA (AGAVACEAE)*. (August 2000).

Qureshi, J. A, y Saxena, P. K. (1992). Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (Pelargonium x hortorum Bailey) varieties. *Plant Cell Reports*, *11*(9), 443–448.

Rahman, M., & Rajora, O. (2001). Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (Populus tremuloides). *Plant Cell Reports*, *20*(6), 531–536. https://doi.org/10.1007/s002990100365

Rakoczy-Trojanowska, M. (2002). The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (Secale cereale L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *7*, 1111–1120.

Ramírez-Malagón, R., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Salas-Araiza, M. D., Nuñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2008). In vitro propagation of three Agave species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *94*(2), 201–207. https://doi.org/10.1007/s11240-008-9405-x

Rathore, M. S., Chikara, J., Mastan, S., Rahman, H., Gopalakrishnan, V. A., & Shekhawat, N. (2011). Assessment of Genetic Stability and Instability of Tissue Culture-Propagated Plantlets of Aloe vera L. by RAPD and ISSR Markers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *165*, 1356–1365. https://doi.org/10.1007/s12010-011-9352-6

Raven, P. H.; Evert, R. F.and Eichhorn, S. E. (1999). *Biology of plants* (6th ed.). New York, U.S.A: Freedman, W. H. and company worth Publishers.

Raymundo, J., Enrique, S., Vázquez, A., Ortiz, G. R., Elisama, M., Luna, M., & Agave, E. (2016). *Fertirriego en vivero a plantas de Agave potatorum Zucc Fertigation in nursery plants of Agave potatorum Zucc micropropagated acclimatized Resumen Introducción*. *7*, 1167–1177.

Reinchenbacher, F. (1985). Conservation of Southwestern Agaves. *Desert Plant*,

7(88), 103–106.

Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., & Scorer, K. N. (1987). In vitro propagation of Agave fourcroydes Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *8*(1), 37–48. https://doi.org/10.1007/BF00040731

Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, M., Arrizon, J., Loera-Quezada, M. M., F.-, & Berrios, E. P., Rincón-Enríquez, G., Quiñones-Aguilar, E. E. & Qui-Zapata, J. A. (2015). La materia prima: Agave tequilana Weber var. azul. In *Ciencia y tecnología del tequila: avances y perspectivas* (Segunda, pp. 17–53). Guadalajara, Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Rodríguez, R. S. E. M. D. S. y L. A. V. (2014). El pulque: bebida e identidad. *Ciencias*, 66–69. Retrieved from https://www.revistaciencias.unam.mx/en/161-revistas/revista-ciencias-111-112/1423-el-pulque-bebida-e-identidad.html

Romero, H. T. (2005). *Comportamiento de explantes de Agave pulquero (Agave atrovirens) en la interacción de dos reguladores de crecimiento*. Instituto Politecnico Nacional.

SAGARPA. (2017). *Planeación Agrícola Nacional (2017-2030). Agave tequilero y mezcalero mexicano*.

Saghai, Maroof, M., Biyashev, R., Yang, G., Zhang, Q., & Allars, R. (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*, 5466–5470.

Sahijram, L., Soneji, J. R., & Bollamma, K. T. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (Musa spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *39*(6), 551–556. https://doi.org/10.1079/IVP2003467

Saiki, R., & Gelfand, D. (1988). Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, *239*, 487–491.

Salinas, F. (2018). Propagación in vitro de Maguey, ¿bueno o malo? Retrieved from Mezcología website: https://mezcologia.mx/8-mitos-maguey-in-vitro/

Salisbury, F. y C. R. (2000). *Fisiología de las plantas* (T. E. P. Spain, Ed.). Madrid, España.

Sanchez-Teyer, L. F., Quiroz-Figueroa, F., Loyola-Vargas, V., & Infante, D. (2003). Culture-induced variation in plants of Coffea arabica cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Molecular Biotechnology*, *23*(2), 107–115. https://doi.org/10.1385/MB:23:2:107

Sánchez, Chiang, N., & M.Jiménez, V. (2009). Tecnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana*, *20*(1), 135–151.

Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., & Rodríguez-Garay, B. (1999).

Efficient in vitro propagation of Agave parrasana Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *56*(3), 163–167. https://doi.org/10.1023/A:1006232911778

Schwarz, O. J., Sharma, A. R., & Beaty, R. M. (2004). Propagation from nonmeristematic tissues: Organogenesis. In *Plant Development and Biotechnology* (pp. 159–172).

Scott Gentry, H. (1982). *Agaves of continental North America.* The University of Arizona Press.

SEMARNAT. (2018). Reserva de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Retrieved from Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales website: https://www.gob.mx/semarnat/prensa/el-area-natural-protegida-tehuacan-cuicatlan-ya-es-patrimonio-de-la-humanidad-163342?idiom=es

Silos-Espino, H., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Valverde-González, M. E., & Paredes-López, O. (2007). Chemical composition and in vitro propagation of agave salmiana "Gentry." *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *82*(3), 355–359. https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512242

Sociedad Española de Nefrología., A. T. , E. S. (1995). Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española de Nefrología. In *Nefrología* (Vol. 15). Retrieved from http://www.revistanefrologia.com/es-biologia-celular-molecular-nefrologia-articulo-X0211699595022901

Solano-Flórez, G., Márquez-Cardona, M. del P., Schuler, I. (2009). *Optimización de la extracción de ADN de Passiflora ligularis para el análisis por medio de marcadores moleculares.* Universitas Scientiarum.

Soneji, J. R., Rao, P. S y Mhatre, M. (2002). Suitability of RAPD for analyzing Spined and Spineless variant regenerants of Pineapple (Ananas comosus L., Merr.). *Plant Molecular Biology Reporter*, *20*, 307a-307i.

Souza-filho, F. J. De, Soares, A. D. J., Paula, B., & Almeida, F. De. (2008). *Antimicrobial Effect and pH of Chlorhexidine Gel and Calcium Hydroxide Alone and Associated with other Materials*. *19*, 28–33.

Streer, H. E. (1979). Embryogenesis and chemically induced organogenesis. *Plant Tissue and Cell Culture*, *318*, 87–99.

Tadeo, F. (2000). Fisiología de las plantas y el estrés. In M.- Hill (Ed.), *Fundamento de Fisiología Vegetal* (pp. 481–497). Interamericana.

Taniguchi, H., Katsumi, M., Yamamoto, Y., Tatsumi, Y., Sano, C. M., Choi, Y.-E. y, & Sano, H. (2008). (2008). In vitro proliferation and genetic diversity of Cypripedium macranthos var. rebunense. *Plant Biotechnology.*, *25*, 341–346.

Valenzuela Sánchez, K. K. (2006). *Desarrollo de tecnologías para la regeneración in vitro y transformación genética del maguey (Agave tequilana Weber, var. azul)*.

van den Bulk, R. W., Löffler, H. J. M., Lindhout, W. H., & Koornneef, M. (1990). Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. *Theoretical and Applied Genetics*, *80*(6), 817–825. https://doi.org/10.1007/BF00224199

Vargas, G. C. C. y J. P. (2005). Cultivo De Células Y Tejidos Vegetales : Fuente De Alimentos Para El Futuro. *Revista Digital Universitaria.*, *6*(11), 1–16. Retrieved from http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf

Vasil, V. & I. K. V. (1994). *Induction and mantenance on embryogenic callus cultures og graminease*.

Venkatachalam, L., Sreedhar, R. V, & Bhagyalakshmi, N. (2007). Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. *Plant Growth Regulation*, *51*(3), 193–205. https://doi.org/10.1007/s10725-006-9154-y

Wang, C., & Tian, M. (2014). Callus-mediated and direct protocorm-like body formation of Bletilla striata and assessment of clonal fidelity using ISSR markers. *Acta Physiologiae Plantarum*, *36*, 2321–2330. https://doi.org/10.1007/s11738-014-1594-9

Wareing P. F., A. C. T. (1985). Determination in plant cells. *Biol.Plant*, *27*(4–5), 241–248.

William M.Roca, L. A. M. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agrícultura (Fundamentos y Aplicaciones). In *CIAT No.6713* (Reimpresió). Cali, Colombia.

Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., & Tingey, S. (1991). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids*, *18*, 6531–6535.

Wu, Q., Cao, H., Luan, Q., Zhang, J., Wang, Z., Warner, J. H., … Ox, O. (2008). *Biomolecule-Assisted Synthesis of Water-Soluble Silver Nanoparticles and Their Biomedical Applications*. *47*(13), 5882–5888.

Yah, Chulim, J. E. (2011). *Estudios de la variación somaclonal en la morfogénesis de Bletia purpurea (Lam.) .* Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco,A.C.

Yang, H., Tabei, Y., Kamada, H., Kayano, T., & Takaiwa, F. (1999). Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. *Plant Cell Reports*, *18*(6), 520–526. https://doi.org/10.1007/s002990050615

Yeh, F. C. y Boyle, T. J. B. (1999). Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgium Journal of Botany*, *129*, 157.

Zietkiewicz, E., Rafalski, J., & Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, *20*, 176–183. https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151